

Molekulargenetische Untersuchung der Kardiomyopathie 'Linksventrikuläre Noncompaction'

Charakterisierung eines neuen Genlokus auf Chromosom 11p15 und die
Identifikation von *MYH7*, *ACTC*, *TNNT2* und *TPM1* als neue
Krankheitsgene

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Dipl.-Biol. Susanne Probst, geb. Ebel
geboren am 13.05.1973 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät I:
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Harald Saumweber
2. Prof. Dr. Achim Leutz
3. Prof. Dr. Ludwig Thierfelder

eingereicht am: 11. März 2008
Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 2008

Abstract

Left ventricular noncompaction of the myocardium (LVNC) constitutes a rare primary cardiomyopathy. The mechanistic basis is assumed to be an arrest in embryonic cardiac development. Mutations in the X-linked TAZ gene are responsible for cases of infantile LVNC whereas the genetic base of late-onset LVNC in most patients is still unresolved.

The objectives of this dissertation were to investigate the genetic defect in family LVNC-105 with autosomal dominant inherited LVNC and to screen a large cohort of patients with isolated LVNC for mutations in candidate genes. In kindred LVNC-105 genome wide linkage analysis revealed significant two-point LOD scores only at chromosome 11p15. A peak 2-point LOD score of 5.06 was obtained with marker D11S902 and a critical interval of 3.2 Mb (4.9 cM) was determined. Among the 40 genes within the disease region one candidate gene was CSRP3, a disease gene for hypertrophic (HCM) and dilated (DCM) cardiomyopathy. Sequence analysis of the genomic CSRP3 region did not reveal mutations in affected family members. Also, analysis of the coding region of further candidate genes contained within the disease locus did not show mutations. Investigations of the genes on transcript level did not detect alterations.

Candidate gene analysis of LDB3, LMNA, Nkx2.5 and BMP10 in 63 index patients with isolated LVNC only one mutation was detected in LDB3. For the first time 7 genes encoding sarcomere proteins, known as disease genes for HCM and DCM, were screened for mutations by DHPLC in LVNC patients. Mutations were found in a significant proportion of the cohort of LVNC index patients (19 %) in MYH7, ACTC, TPM1 and TNNT2. Clinical evaluations demonstrated familial disease in 7 of 12 probands with sarcomere gene mutations. MYH7 mutations segregated with the disease in 4 autosomal dominant LVNC kindreds. MYH7 was identified as the most prevalent LVNC disease gene (13 %) in this cohort. Modified residues in MYH7 were mainly located within the ATP binding site.

In conclusion, LVNC belongs to the spectrum of cardiomyopathies originating in molecular defects of the sarcomere.

Keywords:

LVNC, genome wide linkage analysis, MYH7, genetics

Zusammenfassung

Die Linksventrikuläre Noncompaction des Myokards (LVNC) ist eine seltene primäre Herzmuskelerkrankung. Es wird angenommen, dass es sich um eine embryonale Entwicklungsstörung des Myokards handelt. Mutationen in dem X-chromosomalen Gen TAZ sind verantwortlich für Fälle von frühkindlicher LVNC während die genetische Ursache autosomal-dominant vererbter adulter LVNC weitgehend unbekannt ist.

In dieser Arbeit wurde die genetische Ursache der LVNC in der Familie LVNC-105 untersucht. Weiterhin wurden in einem großen Kollektiv von LVNC-Indexpatienten Kandidatengenanalysen durchgeführt. Bei der Familie LVNC-105 zeigte die genomweite Kopplungsanalyse nur signifikant hohe 2-Punkt-LOD-Werte auf Chromosom 11p15. Der maximale 2-Punkt-LOD-Wert betrug 5,06 bei D11S902 und der Locus konnte auf 3,2 Mb (4,9 cM) eingengt werden. Unter den 40 Genen des Erkrankungslokus war das Kandidatengen CSRP3, das bereits für 2 andere Kardiomyopathien, die dilatative und die hypertrophe Kardiomyopathie (DCM und HCM), als Krankheitsgen beschrieben wurde. Die Sequenzierung des genomischen Bereichs von CSRP3 zeigte keine Mutation bei den betroffenen Familienmitgliedern. Auch die Analyse von weiteren, im Locus enthaltenen Genen ergab keine Mutation in kodierenden Exons. Auch Untersuchungen auf Transkriptebeine offenbarten keine genetische Veränderung.

Bei der Sequenzierung der LVNC-Kandidatengene LDB3, LMNA, Nkx2.5 und BMP10 bei 63 erwachsenen Indexpatienten mit isolierter LVNC wurde nur eine Mutation in LDB3 gefunden. Erstmals wurden auch 7 Gene, die für sarkomere Proteine kodieren und als Krankheitsgene für HCM und DCM bekannt sind, mittels DHPLC untersucht. Es wurden Mutationen in einem großen Anteil der LVNC-Indexpatienten (19 %) in MYH7, ACTC, TPM1 und TNNT2 identifiziert. Klinische Untersuchungen zeigten bei 7 von 12 Patienten mit Mutationen das Vorliegen einer familiären LVNC. In 4 autosomal-dominanten LVNC-Familien kosegregierten die MYH7 Mutationen mit der Erkrankung. MYH7 war mit einem Anteil von 13 % das häufigste Krankheitsgen. Die Mutationen in MYH7 lagen vorwiegend in der ATP-Bindungsstelle.

LVNC gehört damit zum Spektrum der Kardiomyopathien, die durch Mutationen in sarkomeren Proteinen hervorgerufen werden können.

Schlagwörter:

LVNC, genomweite Linkageanalyse, MYH7, Genetik

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kardiomyopathien	1
1.2	Linksventrikuläre Noncompaction des Myokards	2
1.2.1	Diagnose und Pathologie der LVNC	3
1.2.2	Mögliche Ätiologie der 'Linksventrikulären Noncompaction' . .	3
1.2.3	Genetik der LVNC	4
1.3	Techniken zur Genidentifikation monogener Erkrankungen	6
1.3.1	Karyotypbestimmung und Array-CGH	6
1.3.2	Genetische Kartierung - Kopplungsanalyse	6
1.4	Kandidatengenanalyse	7
1.4.1	Direkte Sequenzierung	7
1.4.2	DHPLC	7
1.4.3	Bioinformatische Methoden	8
1.5	Ziel der Arbeit	10
2	Material	11
2.1	Verbrauchsmaterialien	11
2.2	Chemikalien und Enzyme	11
2.3	Verwendete Kits	13
2.4	Lösungen, Puffer und Kulturmedien	13
3	Methoden	15
3.1	DNA-Präparationen	15
3.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Gesamt-Blut	15
3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	15
3.2	RNA-Präparation	16
3.2.1	RNA-Präparation aus Gewebe	16
3.2.2	RNA-Präparation aus Gesamt-Blut	16

3.2.3	DNaseI-Behandlung präparierter Gesamt-RNA	17
3.3	Amplifikation von DNA mittels PCR	17
3.3.1	Standard-PCR	17
3.3.2	Standard-PCR für die genomweite Kopplungsanalyse	18
3.3.3	Amplifikation langer PCR-Produkte	18
3.3.4	Amplifikation GC-reicher DNA-Fragmente	19
3.3.5	PCR-Bedingungen für die Analyse von <i>BMP10</i> , <i>Nkx2.5</i> , <i>ZASP</i> und <i>LMNA</i>	20
3.3.6	Standard-PCR für die DHPLC-Analyse	21
3.3.7	PCR-Bedingungen zur Amplifikation des <i>MYH7</i> -Transkripts aus Blut	22
3.4	Reverse Transkription von RNA	22
3.5	Sequenzierung von PCR-Produkten	22
3.6	DHPLC-Analyse	23
3.6.1	Methode	23
3.6.2	Bestimmung der Analysetemperatur und -bedingungen	23
3.6.3	Durchführung	24
3.7	DNA-Arbeiten	24
3.7.1	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	24
3.7.2	Restriktionsverdau von DNA	24
3.7.3	Agarosegel-Elektrophorese	24
3.7.4	Aufreinigung von DNA aus Agarosegel	25
3.7.5	Ligation	25
3.7.6	Transformation	25
3.7.7	Bakterienkultur	25
3.8	Expressionsstudien	25
3.9	Southern-Blot-Hybridisierung	27
3.10	Bestimmung des Karyotyps und Array-CGH	28
3.11	Phänotypisierung der Indexpatienten	29
3.12	Kopplungsanalyse	29
3.12.1	Phänotypisierung von Familienmitgliedern	29
3.12.2	Genotypisierung	29
3.12.3	Kopplungsanalyse	30
3.13	Präparation von Rattenorganen	31
3.13.1	Präparation von Organen adulter Ratten	31
3.13.2	Präparation von fetalen Rattenherzen	31
3.14	Bioinformatische Methoden	32

3.14.1	Datenbanken	32
3.14.2	Software	32
3.14.3	Enhancer Element Locator	32
3.14.4	Ermittlung hoch-konservierter DNA-Bereiche	33
3.14.5	Endeavour	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Phänotypische Charakterisierung der Familie LVNC-105	35
4.2	Genetische Charakterisierung der Familie LVNC-105	36
4.2.1	Bestimmung des Karyotyps	36
4.2.2	Array-CGH	37
4.2.3	Analyse der Kopplung zu bekannten LVNC-, DCM- und HCM-Loci	37
4.3	Genomweite Kopplungsanalyse in der Familie LVNC-105	38
4.3.1	Feinkartierung auf Chromosom 11p15	39
4.4	Charakterisierung des Erkrankungslokus auf Chromosom 11p15	43
4.4.1	Genomische Untersuchungen zu <i>CSRP3</i> und <i>PIK3C2A</i>	44
4.4.2	DNA-Mutationsanalyse der Gene im Locus	45
4.5	Expressionsanalyse durch semi-quantitative RT-PCR	45
4.5.1	Humanes RNA-Expressionsmuster der Gene	45
4.5.2	Analyse der Expression in den Lymphozyten von Patienten . . .	46
4.5.3	Expressionsanalyse im embryonalen Rattenherzen	46
4.6	Ergebnisse der bioinformatischen Analysen	48
4.6.1	Enhancer Element Locator	48
4.6.2	Ultra-konservierte Bereiche	48
4.6.3	Priorisierung der Gene mit 'Endeavour'	48
4.7	Untersuchung der Kopplung des neuen Lokus auf 11p15 in zwei kleineren Familien mit isolierter LVNC	50
4.8	Kandidatengen-Screening bei Indexpatienten mit isolierter LVNC	50
4.8.1	Sequenzierung der bekannten Kandidatengene für isolierte LVNC <i>LDB3</i> , <i>LMNA</i> , <i>Nkx2.5</i> und <i>BMP10</i>	51
4.8.2	Mutationsanalyse von Genen sarkomerer Proteine bei LVNC- Indexpatienten	52

5	Diskussion	61
5.1	Klinische Evaluierung der Familie LVNC-105	61
5.2	Genetische Charakterisierung der Familie LVNC-105	62
5.3	Neuer Erkrankungsloкус für LVNC auf Chromosom 11p15	62
5.4	Kandidatengene im LVNC-Lokus auf Chromosom 11p15	63
5.4.1	Mutationsanalyse der Gene im Locus	63
5.4.2	Expressionsuntersuchungen der Kandidatengene	64
5.4.3	Bioinformatische Analysen	65
5.4.4	Weiterführende Analysen zum krankheitsassoziierten Lokus	65
5.5	LVNC-Kandidatengene	66
5.5.1	Sequenzierung bekannter LVNC-Kandidatengene	66
5.5.2	Gene sarkomerer Proteine als neue LVNC-Krankheitsgene . . .	67
5.5.3	Sequenzvariation in <i>MYL2</i>	70
5.5.4	Mutationen in sarkomeren Proteinen führen zu verschiedenen Kardiomyopathien	70
5.5.5	Störung der myokardialen Entwicklung	71
5.6	Tiermodelle und weitere Kandidatengene	71
5.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	72
A	Gen-Liste des LVNC-Lokus	75
B	Publikationen	77
	Abkürzungen	79
	Danksagung	81
	Literaturverzeichnis	83
	Abbildungsverzeichnis	101
	Tabellenverzeichnis	103

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind Erkrankungen des Herzmuskels (Myokard). Sie führen zu strukturellen Veränderungen des Myokards, die charakteristisch für die verschiedenen Formen der Kardiomyopathie sind, z. B. Verdickung der Herzmuskulatur, Vergrößerung der Herzkammern, Atrophie des Myokards mit Ersatz durch Binde- und Fettgewebe. Kardiomyopathien haben unterschiedliche funktionelle Störungen wie eingeschränkte Pumpfunktion und gestörte Erregungsausbreitung bis hin zum Kammerflimmern zur Folge.

Die verschiedenen Formen der Kardiomyopathien werden nach der AHA-Klassifikation in 2 Hauptgruppen eingeteilt [68]. Die 1. Hauptgruppe bilden die primären Kardiomyopathien, zu denen die hypertrophe (HCM), die dilatative (DCM), die restriktive (RCM), die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) und auch die linksventrikuläre Noncompaction (LVNC) gehört. Die Ursache dieser Erkrankungen ist oft unklar, ein Teil der Fälle ist jedoch nachweislich genetisch bedingt [35].

Bei den sekundären Kardiomyopathien, der 2. Hauptgruppe, sind Herzvergrößerung oder Funktionsstörung Folge anderer Grunderkrankungen, wie z. B. angeborene Stoffwechselerkrankungen, Entzündungen, Infektionen oder toxische Einwirkungen (Alkohol, Medikamente).

Kardiomyopathien gehören zu den prognostisch ungünstigen Herzerkrankungen mit einer Sterberate von 5-15 % pro Jahr. Die Haupttodesursachen sind schwere Herzinsuffizienz und plötzlicher Herztod.

1.2 Linksventrikuläre Noncompaction des Myokards

Die ersten Veröffentlichungen über Patienten mit einer neuartigen Herzmuskelerkrankung in den Jahren 1984 und 1986 berichteten von einer angeborenen Anomalie des Myokardiums mit unklarer Ursache [27, 48]. Dabei wies der verdickte, schwammartige Herzmuskel tiefe Aushöhlungen (Rezessi) zwischen zahlreichen Muskelfasern (Trabekeln) auf, die in die Herzkammer hineinragen. Diese Befunde betrafen hauptsächlich den linken Ventrikel (Abb. 1.1).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Herzmuskelerkrankung von anderen Erkrankungen des Myokards unterschieden und 1990 Nichtkompaktierung des linksventrikulären Herzmuskels (noncompaction of left ventricular myocardium) genannt [23].

Die Zuordnung zu den unklassifizierten Kardiomyopathien erfolgte 1996 [97] und 10 Jahre später wurde die LVNC als eigenständige primäre Kardiomyopathie eingeführt [68].

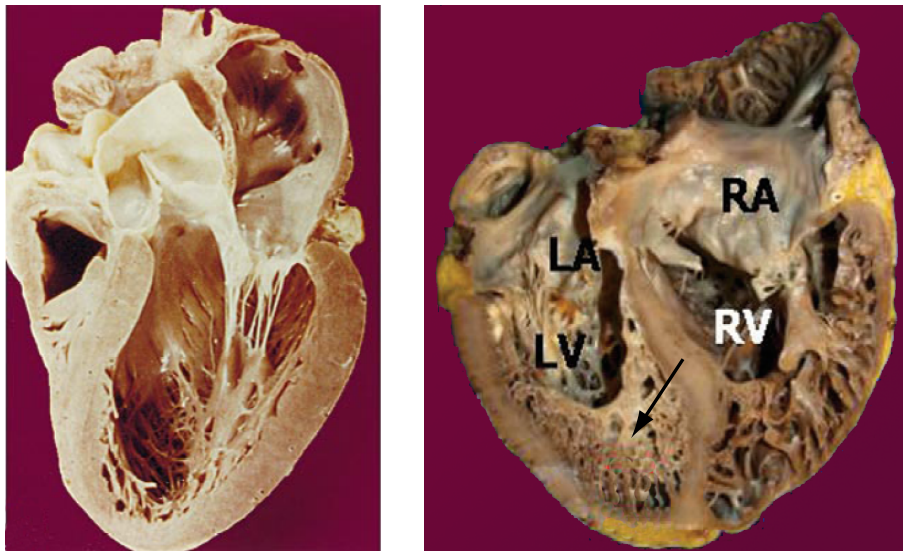


Abbildung 1.1: Vergleichende Darstellung des Myokards. Links: gesundes Herz [108]; Rechts: LVNC-Herz, das Myokard ist stark trabekularisiert und die kompakte Schicht ist dünn (verändert entnommen [94]).

Klinische Studien zeigten, dass diese seltene Kardiomyopathie hauptsächlich im linken Ventrikel zu finden ist und nur sehr selten beide Herzkammern betroffen sind. Die Erkrankung wird in allen Altersstufen und häufiger bei männlichen Individuen (56 % bis 82 %) diagnostiziert [98, 23, 80, 45].

Die Befunde bei Patienten mit LVNC reichen von normaler linksventrikulärer Funktion bis hin zu schwerem Herzversagen, wobei in klinischen Studien die meisten Patienten unter Herzinsuffizienz leiden [76, 80]. Weitere häufige Symptome sind Arrhythmien und Embolien [66].

Bei der linksventrikulären Noncompaction werden zwei Formen unterschieden. Die isolierte Form der LVNC ist nicht mit weiteren Herzanomalien assoziiert. Bei der nicht isolierten Form treten zusätzlich strukturelle Herzanomalien auf [23].

1.2.1 Diagnose und Pathologie der LVNC

Die Darstellung des pathologisch veränderten Herzmuskels erfolgt durch die 2D-Echokardiographie.

Für die Diagnose der LVNC müssen folgende morphologische Kriterien zutreffen [49]:

1. Das Myokard besteht aus zwei Schichten: einer kompakten dünnen epikardialen Schicht und einer viel dickeren nicht kompakten endokardialen Schicht mit Trabekeln und tiefen Recessi. Für die Diagnose muss das Verhältnis von nicht kompakter zu kompakter Schicht größer als 2 sein .
2. Der Blutfluss aus dem Ventrikellumen in die tiefen intertrabekularen Rezessi kann mit der Farb-Doppler-Sonographie nachgewiesen werden.
3. Die vorherrschende Lokalisation der pathologischen Veränderung ist in der Herzspitze.

Für die isolierte Form der LVNC gilt außerdem die Abwesenheit weiterer Herzanomalien. LVNC kann mit eingeschränkter Kontraktilität (systolischer Funktion) und regional verminderter Herzwandbewegung (Hypokinesie) assoziiert sein.

1.2.2 Mögliche Ätiologie der ‘Linksventrikulären Noncompaction’

Die für die Entstehung der LVNC verantwortlichen pathologischen Mechanismen sind bisher unbekannt. Es gibt jedoch 2 Hypothesen.

Die vorherrschende Annahme ist ein intrauteriner Stillstand der myokardialen Entwicklung. Während der Kardiogenese erfolgt nach der 8. Woche die Verdichtung des vorher trabekularisierten Myokards zu einem kompakten Herzmuskel. Dieser Prozess scheint gestört zu sein. So war das veränderte Myokard bei einigen Patienten bereits in früher Kindheit und auch pränatal zu sehen [50].

Bei der zweiten Hypothese ist eine spätere Entstehung der LVNC möglich. Die Veränderung des Myokards erfolgt, wie bei anderen Kardiomyopathien, durch strukturellen und funktionellen Umbau des Myokards (z. B. durch Mutationen in sarkomeren Proteinen [31]).

1.2.3 Genetik der LVNC

Ein familiär gehäuftes Auftreten der LVNC ist zum ersten Mal 1990 beschrieben worden [23]. Danach folgen weitere einzelne Beschreibungen von Familien, z. B. von Sasse-Klaassen et al. mit 7 von 9 Familien mit mehrere betroffenen Verwandten [102, 46]. Bisher sind Patienten jedoch nicht systematisch prospektiv untersucht worden und somit eine Aussage zur Häufigkeit schwierig. Xing et al. berichten aber von familiärem Auftreten bei etwa 25 % der 79 untersuchten LVNC-Patienten [124]. Folgende genetische Untersuchungen bei Patienten mit LVNC zeigten, dass die Ursachen für diese Kardiomyopathie sehr heterogen sind.

Das erste Gen, in dem Mutationen bei Patienten mit LVNC gefunden wurden, war *Tafazzin* (früher *G4.5*) (Xq28) [46]. Dieses Gen kodiert für eine Phospholipid-Acyltransferase und hat Auswirkungen auf die Anordnung und Stabilität der Komplexe der Atmungskette in der Mitochondrienmembran [19]. Die Erkrankung tritt bei den Patienten bereits im Säuglingsalter auf und wird X-chromosomal vererbt. Veränderungen in *Tafazzin* sind vorher bereits bei infantiler dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und dem Barth Syndrom gefunden worden, wodurch LVNC allelisch mit diesen beiden Erkrankungen ist.

Genetisch unterschiedlich dazu ist die adulte Form der LVNC, bei der in der Mehrzahl der Fälle ein autosomal-dominanter Erbgang auftritt [102]. Eine Aminosäuresubstitution in α -*Dystrobrevin* (*DTNA*) (18q12) ist bei einer Familie mit LVNC und variablen Formen von angeborenen Herzfehlern gefunden worden [46]. In einer Familie mit vererbter DCM und einer Mutation im Gen *LaminA/C* (*LMNA*) (1q21) zeigte ein Familienmitglied die charakteristische kardiale Morphologie einer LVNC [40]. Desweiteren sind Mutationen in *LIM domain binding 3* (*LDB3*) (10q22) bei Indexpatienten mit LVNC gefunden worden [120]. Diese Gene kodieren für Strukturproteine des Zytoskeletts, der Kernlamina beziehungsweise der Z-Scheibe (Abb. 1.2). Mutationen in *LMNA* und *LDB3* verursachen auch eine dilatative Kardiomyopathie [28, 120].

Ein familiäres Auftreten der Erkrankung ist relativ häufig (12 - 50 %) [23, 98].

Neben den beim Menschen gefundenen Genen gibt es verschiedene knock-out(KO)-Mausmodelle, die auch nach dem Kompaktierungszeitpunkt ein morphologisch typisches hypertrabekularisiertes Myokard zeigen. Bei den ausgeschalteten Genen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren oder regulatorische Proteine, die für die korrekte embryonale Entwicklung des Herzmuskels wichtig sind. Der ventrikelspezifische Knock-out von *Nkx2.5* oder der komplette KO von *FKBP12* führt zu einer Überexpression von *BMP10* [88]. *BMP10* ist für die Proliferation der Kardiomyozyten während der Embryogenese erforderlich [21].

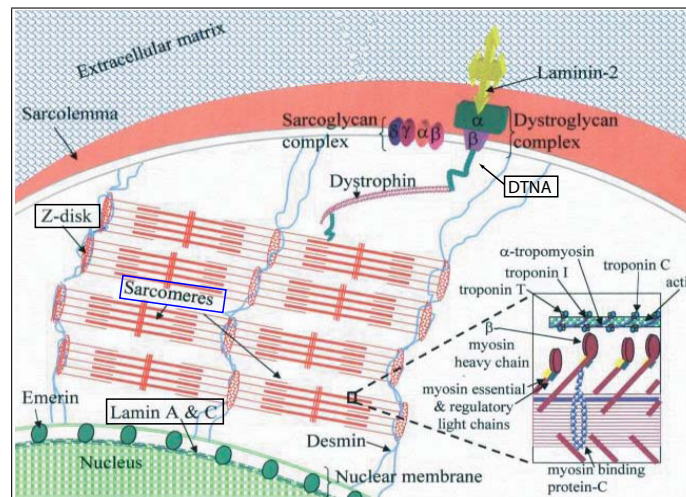


Abbildung 1.2: Zelluläre Lokalisation und Interaktion von an HCM, DCM und LVNC beteiligten Proteinen. Proteine mit LVNC-Mutationen sind schwarz umrandet (verändert nach [75]).

Bisher sind aber noch keine Mutationen in den Genen *FKBP12*, *BMP10* und *Nkx2.5* bei Patienten mit LVNC gefunden worden [110, 77, 56, 21]. Bei einer Patientin mit komplexem Herzfehler und LVNC ist eine distale Deletion auf Chromosom 5q festgestellt worden. In diesem Bereich liegt auch das *Nkx2.5*-Gen [90].

Die genetischen Ursachen können nur bei <5 % der Patienten mit LVNC nachgewiesen werden [56, 22]. Bei den meisten Erkrankten ist der molekulare Defekt jedoch bisher unbekannt, so dass es keinen Hinweis auf häufige Krankheitsgene gibt. Es liegen keine publizierten Daten vor, die eine Untersuchung von Genen sarkomerer Proteine auf Mutationen bei LVNC-Patienten beschreiben. Veränderungen in diesen Proteinen sind die Hauptursache für genetisch bedingte hypertrophe und dilatative Kardiomyopathie (HCM, DCM) und es ist bekannt, dass Mutationen in den selben sarkomeren Genen verschiedene Herzmuskelerkrankungen verursachen [70]. Mogensen et al. hatten Mutationen im kardialen α -Aktin (ACTC) in einer Familie mit HCM gefunden, obwohl dieses Gen vorher nur im Zusammenhang mit DCM bekannt war. Danach wurde in weiteren Proteinen des Sarkomers, wie z. B. *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3*, *MYL3* und *MYL3*, Mutationen für HCM und auch DCM veröffentlicht [53]. Mutationen in *TNNI3* sind auch bei Patienten mit RCM gefunden worden [71]. Auf der anderen Seite erfüllen einige LVNC-Patienten neben den diagnostischen Merkmalen der LVNC auch die anderer Kardiomyopathien (DCM, HCM und RCM) [12]. Dies gilt insbesondere für die linksventrikuläre Dilatation und Funktionseinschränkung der DCM. Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, dass Veränderungen in sarkomeren Proteinen auch zu LVNC führen können.

1.3 Techniken zur Genidentifikation monogener Erkrankungen

Die Ursache monogener Erkrankungen ist eine einzelne genetische Veränderung, im Gegensatz zu polygen oder multifaktoriell bedingten Erkrankungen. Monogene Erkrankungen folgen den Mendelschen Gesetzen und haben einen dominanten oder rezessiven Erbgang und sind autosomal oder geschlechtschromosomal gebunden.

Bei genetisch bedingten Erkrankungen kann der molekulare Defekt sehr unterschiedlich sein. Die Größe reicht von chromosomalen Abberationen über die Deletion, Insertion und Duplikationen einzelner Exons bis hin zu Punktmutationen. Die Punktmutationen können in kodierenden Exons liegen und zu Aminosäuresubstitutionen oder Leserahmenverschiebung (frame shift) führen oder sich in nicht kodierenden Bereichen befinden und das Spleißen oder die Regulation der Expression von Genen beeinflussen [58, 106].

1.3.1 Karyotypbestimmung und Array-CGH

Große chromosomale Veränderungen bei Patienten können durch die Bestimmung des Karyotyps erkannt werden. Dabei wird die Anzahl der Chromosomen und das Bandenmuster der Metaphasechromosomen bestimmt.

Deletionen und Duplikationen chromosomaler Abschnitte, die für eine Karyotypbestimmung zu klein sind, können durch vergleichende genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) zwischen Patient- und Kontroll-DNA ermittelt werden. Eine genomweite und schnelle Methode ist die Array-CGH, bei der sich die BAC-Sonden auf einem Chip befinden. Die durchschnittliche Auflösung eines 32k-Chips (ca. 32.000 Sonden) ist 70kb. Abberationen, die kleiner sind, und Inversionen können mit dieser Methode jedoch nicht detektiert werden.

1.3.2 Genetische Kartierung - Kopplungsanalyse

Für die Ermittlung der genetischen Ursache monogener Erkrankungen bei Familien wird die Kopplungsanalyse verwendet. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kopplungsanalyse ist eine Familie mit einem großen Stammbaum über mehrere Generationen. Bei der Kopplungsanalyse bedient man sich der Tatsache, dass (Krankheits-)Gene und STR-Polymorphismen (*Short Tandem Repeat*) gemeinsam vererbt werden, wenn sie auf einem Chromosomenabschnitt dicht beieinander liegen.

Ist die Erkrankung in einer Familie nicht mit einem bekannten Genort gekoppelt, wird eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Konnte ein STR-Polymorphis-

mus identifiziert worden, bei dem ein Allel in der Familie mit der Erkrankung kosegregiert, kann durch Feinkartierung (geringer Abstand der verwendeten STR-Marker) der krankheitsassoziierte Bereich, mit den darin enthaltenen Genen, eingeengt werden. Genetische Grundlage für die Feinkartierung sind homologe Rekombinationen. Während der Meiose können homologe Chromosomen bestimmte Abschnitte austauschen (*Crossing-over*). Diese Rekombinationsereignisse führen zum Austausch von Allelen, was in einem veränderten Haplotyp der Individuen sichtbar wird. Je enger Gen und STR-Polymorphismus beieinander liegen, desto seltener werden diese durch Rekombinationsereignisse getrennt. Rekombinationen von STR-Polymorphismen bei Familienmitgliedern kennzeichnen die Grenzen des krankheitsassoziierten Bereiches in dieser Familie, da die STR-Polymorphismen weiter entfernt vom Krankheitsgen liegen und nicht mit ihm im Zusammenhang stehen.

1.4 Kandidatengenanalyse

Für alle Kardiomyopathien sind verschiedene Gene bekannt, bei denen molekulare Defekte krankheitsverursachend sind. Die Fragestellung der Häufigkeitsverteilung von Mutationen in diesen Kandidatengen kann durch Sequenzanalyse in einem Patientenkollektiv untersucht werden. Dabei kann es sich zeigen, dass in bestimmten Genen sehr oft oder nur selten die Ursache zu finden ist [35, 56]. Diese Erkenntnisse sind für mögliche klinische Screenings bei Patienten von Bedeutung.

Der molekulare Defekt genetisch bedingter Erkrankungen ist in den meisten Fällen in den kodierenden Exons funktional wichtiger Gene zu finden. Mutationen in nicht kodierenden Bereichen, die das Spleißen oder die Regulation von Gene beeinflussen, kommen ebenfalls vor [106].

1.4.1 Direkte Sequenzierung

Um die Mutation in Kandidatengen oder im krankheitsassoziierten Locus zu finden, wird in den meisten Fällen eine direkte Sequenzierung der Exons von ausgewählten Genen durchgeführt.

1.4.2 DHPLC

Eine andere Möglichkeit um Sequenzunterschiede zu detektieren ist die Methode der DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography). Dieses Verfahren wurde erstmals 1995 von Oefner und Underhill beschrieben [81]. Dabei wird eine

Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie und das unterschiedliche Schmelzverhalten von homomeren und heteromeren PCR-Produkten kombiniert, um DNA-Fragmente mit Sequenzabweichungen zu erkennen.

Die stationäre Phase der Chromatographie ist eine hydrophobe Säulenmatrix (Polystyren-Divinylbenzol-Partikel) und als mobile Phase wird TEAA (Triethylammoniumacetat) verwendet [44]. Die hydrophoben Alkylketten von TEAA binden an die Säulenmatrix, während die Ammonium-Kationen von TEAA über elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen die DNA-Fragmente an die Säulenmatrix binden. Eine kontinuierlich steigende Konzentration von Acetonitril, das kompetitiv zur DNA mit TEAA wechselwirkt, wäscht die DNA langsam von der Säule. Bei einer fragmentabhängigen optimalen Analysetemperatur eluieren die thermolabileren heteromeren PCR-Produkte zeitlich vor den Homomeren (Abb. 1.3).

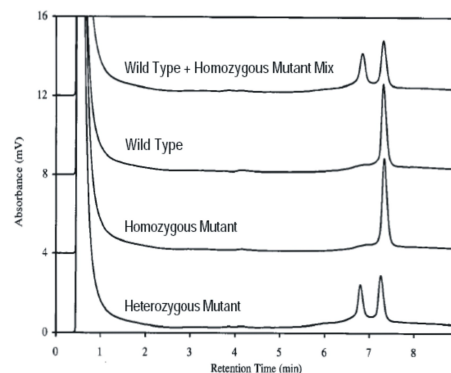


Abbildung 1.3: Beispiel für die Unterscheidung von homomeren und heteromeren DNA-Fragmenten mit DHPLC.(entnommen aus [105])

1.4.3 Bioinformatische Methoden

Die Weiterentwicklung der Bioinformatik erlaubt eine immer stärkere in silico-Interpretation und -Vorhersage relevanter Sachverhalte durch die Auswertung der bisher gesammelten Datenmengen. Die Verwendung bioinformatischer Methoden ist ein wichtiger Bestandteil der biologischen Forschung.

‘Enhancer Element Locator’

Neben den proteinkodierenden Sequenzen beinhaltet das Genom auch eine große Menge an regulatorischen Bereichen. Enhancer gehören zu den *cis*-regulatorischen DNA-Elementen. Diese zeichnen sich durch die Bündelung von Bindungsstellen für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (TF) aus und steuern die Expression der zugeordneten proteinkodierenden Gene [25]. Um diese Enhancer-Elemente im Säuger genom in sili-

co identifizieren zu können, ist von Hallikas et al. das Computerprogramm 'Enhancer Element Locator' entwickelt worden [39].

Ermittlung hoch-konservierter DNA-Bereiche

Das Genom enthält viele konservierte Abschnitte, von denen nur ein Teil proteinkodierend ist [10]. Die Konservierung der nicht kodierenden DNA-Elemente scheint das Resultat einer evolutionären Selektion zu sein und viele bisher nicht charakterisierte funktionelle Elemente zu enthalten, wie z. B. transkriptionale und post-transkriptionale Regulationselemente, chromatinassoziierte Regionen, nicht kodierende RNAs oder auch neuartige Funktionselemente [26]. Diese hoch-konservierten nicht kodierenden Sequenzen können auch entwicklungsassoziiert sein [123]. Bejerano et al. haben ein ausführliches Protokoll veröffentlicht, um mit der UCSC Genome Browser Datenbank diese hoch-konservierten DNA-Bereiche in einem fraglichen Genomabschnitt zu finden [11, 55].

'Endeavour'-Software

Für eine Reihe von genetisch bedingten Erkrankungen sind die verursachenden molekularen Defekte bekannt. In vielen Fällen sind jedoch nur durch Kopplungsanalyse ermittelte Loci vorhanden, ohne dass das entscheidende Gen gefunden wurde. Für die Identifikation eines Krankheitsgenes ist die Priorisierung der Gene in einem solchen Locus ein wichtiger Anfang. Aerts et al. haben eine Software entwickelt, die eine Priorisierung von Kandidatengenen basierend auf ihrer Ähnlichkeit zu bereits bekannten Krankheitsgenen vornimmt [3].

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war im ersten Teil die genetische Ursache der Kardiomyopathie ‘Linksventrikuläre Noncompaction’ (LVNC) in der Familie LVNC-105 zu identifizieren und im zweiten Teil ein Mutationsscreening in einem Patientenkollektiv mit isolierter LVNC durchzuführen.

Bei der Familie LVNC-105 sollte der zugrunde liegende molekulare Defekt durch verschiedene genetische Methoden untersucht werden: Ausschluss chromosomaler Abberationen durch Karyotypbestimmung und Array-CGH, Kopplungsanalyse bekannter Kardiomyopathie-Loci auf mögliche Verbindung zur Erkrankung in der Familie LVNC-105 und anschließende genomweite Kopplungsanalyse zur Ermittlung eines neuen Erkrankungslokus mit Feinkartierung. Die Charakterisierung des krankheitsassoziierten Lokus, auch unter Verwendung neuer bioinformatischer Methoden, und die Sequenzanalyse der darin enthaltenen Gene und konservierter/funktioneller Bereiche sollten zur Aufdeckung der Mutation in der Familie LVNC-105 führen.

Ein weiteres Ziel war, die Häufigkeitsverteilung von Mutationen in LVNC-Kandidatengenen in einem großen Patientenkollektiv mit isolierter ‘Linksventrikuläre Noncompaction’ zu untersuchen. Da die genetische Ursache der Erkrankung erst bei einem sehr geringen Anteil der Patienten ($< 5\%$) gefunden wurde, sollten neben bekannten LVNC-Kandidatengenen auch Kandidatengene anderer Herzmuskelerkrankungen untersucht werden. Dabei sollte außer der direkten Sequenzierung auch die DHPLC-Methode angewendet werden.

Kapitel 2

Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Die bei dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

Ambion Inc.
Amersham Buchler GmbH
Applied Biosystems
Carl Roth GmbH
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
Falcon
Greiner Bio-One GmbH
Kodak GmbH
Millipore
Pharmacia LKB GmbH
QIAGEN GmbH
Whatman

2.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme folgender Firmen wurden verwendet:

Chemikalien:

Bio-Rad Laboratories
Boehringer Ingelheim GmbH

Carl Roth GmbH
 Difco[®] Laboratories
 Fluka AG
 Gibco/BRL GmbH
 Invitrogen[™] life technologies
 Kodak GmbH
 Merck KGaA
 MWG Biotech GmbH
 Pharmacia LKB GmbH
 Promega Corporation
 Serva Elektrophoresis GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Enzyme:

Amersham Bioscience	Restriktionsenzyme
Applied Biosystems	BigDye [™] Cycle Sequencing Kit
QIAGEN GmbH	DNA-Polymerasen
InViTek GmbH	DNA-Polymerase
Clontech Laboratories, Inc.	DNA-Polymerasen
TaKaRa Bio Inc.	DNA-Polymerasen
Invitrogen [™] life technologies	DNaseI, SuperscriptIII
Fermentas GmbH	Restriktionsenzyme
Gibco/BRL GmbH	Restriktionsenzyme
Boehringer Ingelheim GmbH	Restriktionsenzyme
New England Biolabs, Inc.	Restriktionsenzyme

Radiochemikalien:

Amersham Buchler GmbH & Co. KG	Megaprime [™] DNA Labelling System
PerkinElmerLife And Analytical Sciences, Inc.	ATP[α - ³² P]

2.3 Verwendete Kits

Nucleospin [®] , Nucleospin [®] -Blood	MACHEREY-NAGEL GmbH
RNeasy [®] Kit, QIAamp [®] RNA Blood Kit	QIAGEN GmbH
TA-Cloning [®] Kit	Invitrogen [™] life technologies
PAX-System	PreAnalytik

2.4 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

Lösungen und Puffer:

1x TTE:	90mM Tris	1x TE:	10mM Tris-HCl (pH 8,0)
	30mM Taurin		1mM Na ₂ EDTA
	1mM Na ₂ EDTA		

10 % SDS : 10 g Na-dodecylsulfat
ad 100 ml H₂O

20x SSC: 3 M NaCl
0,3 M Na₃-citrat
pH 7,0

Kulturmedien:

LB-Medium (flüssig):

- 1 % (w/v) Bacto Trypton
- 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract
- 0,5 % (w/v) NaCl
- pH 7,5

LB-Medium (fest):

- 1 % (w/v) Bacto Trypton
- 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract
- 0,5 % (w/v) NaCl
- 1,5 % Bacto Agar
- pH 7,5

Bei Zugabe von Ampicillin betrug die Endkonzentration 100 µg/ml.

Kapitel 3

Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle gentechnischen Arbeiten nach Standardmethoden gemäß *Molecular Cloning/ A Laboratory Manual* [100], *Current Protocols of Molecular Biology* [1] oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

3.1 DNA-Präparationen

3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Gesamt-Blut

Für die Präparation der genomischen DNA ist Gesamt-Blut aus EDTA-Blutentnahmeröhrchen verwendet worden. Dafür wurden aus 200 μ l Blut die DNA mit Hilfe des Kits ‘NucleoSpin[®]-Blood’ (Macherey-Nagel) isoliert.

Für größere Mengen sind 2ml Blut und das NucleoSpin[®]-Blood L-Kit (Macherey-Nagel) verwendet worden. Die DNA-Konzentration ist nach der Präparation mit dem NanoDrop[®] ND-1000-Spektrometer (PeqLab) bestimmt worden. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin[®] Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Dabei wurden 2 ml Bakterienkultur in LB-Medium verwendet und nach den Angaben des Herstellers bearbeitet.

3.2 RNA-Präparation

3.2.1 RNA-Präparation aus Gewebe

Präparation von RNA mit TRIzol™-Reagenz

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe erfolgt mittels TRIzol™-Reagenz (Gibco/BRL). Es wurden maximal 30 mg Gewebe verwendet und in 1 ml TRIzol™-Reagenz mit dem Rotor/Stator-Homogenisator zerkleinert. Nach der Isolierung wurde die Gesamt-RNA in 30 μ l DEPC-H₂O gelöst und bei -80 °C gelagert. Vor der weiteren Verwendung erfolgt der Verdau der genomischen DNA durch DNaseI (siehe 3.2.3).

Präparation von RNA mit den RNeasy-Kit

Für eine schnellere Präparation von RNA wurde das RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) verwendet. Maximal 20 mg des Gewebes wurden in 600 μ l RTL-Puffer mit β -Mercaptoethanol homogenisiert und nach den Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Die Elution der RNA von der Säule erfolgte mit 50 μ l des mitgeliefertem RNase-freien Wassers und wurde dann bei -80 °C gelagert. Vor der weiteren Verwendung wurde die enthaltene genomische DNA durch DNaseI verdaut (siehe 3.2.3).

3.2.2 RNA-Präparation aus Gesamt-Blut

Präparation von RNA mit TRIzol™-Reagenz

Die Präparation von RNA mit TRIzol™-Reagenz ist nur aus frischen Blut möglich. Es wurden Blut-Röhrchen verwendet, die nicht älter als zwei Tage und in dieser Zeit nicht gefroren waren.

2,5 ml dieses Blutes wurden mit 7,5 ml TRIzol™-Reagenz gemischt, um eine Lyse der Leukozyten herbeizuführen. Die weitere Präparation erfolgt laut Anleitung des Herstellers. Nach der Ethanolfällung ist die RNA in 50 μ l DEPC-Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert worden. Vor der weiteren Verwendung wurde die genomische DNA durch DNaseI verdaut (siehe 3.2.3).

Präparation von Gesamt-RNA mit dem QIAamp®RNA Blood Mini Kit

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus frischem Blut wurde auch mit dem QIAamp®RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) durchgeführt. Dafür wurden 1,5 ml Blut mit 7,5 ml EL-Puffer gemischt und 10 min in Eis inkubiert. Die anschließenden Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Elution der RNA mit 40 μ l RNase-freiem Wasser wurde zweimal durchgeführt und die insgesamt 80 μ l dann bei -80 °C gelagert.

Präparation von Gesamt-RNA mit dem PAX-System

Die Verwendung des PAX-Systems (PreAnalytix) erfolgte, wenn es nicht möglich war frische Blut-Röhrchen (nicht älter als 2 Tage) zu erhalten.

Die Blutentnahme wurde mit speziellen PAX-Blut-Röhrchen (PreAnalytix), die eine patentierte RNA-Stabilisierungslösung enthalten, durchgeführt. Die RNA bleibt in diesen Röhrchen bei 4 °C bis zu 4 Tagen stabil.

Für die Präparation der RNA wurden die Leukozyten aus dem gesamten Volumen (2,5 ml Blut und 7,5 ml RNA-Stabilisierungslösung) abzentrifugiert und unter Verwendung des PAXgeneTM Blood RNA Kits (PreAnalytiX) weiter verarbeitet. Die abschließende Elution der RNA von der Säule erfolgte zweimal mit 40 µl des mitgelieferten Elutionspuffers BR5. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Vor der weiteren Verwendung wurde die genomische DNA durch DNaseI verdaut (siehe 3.2.3).

3.2.3 DNaseI-Behandlung präparierter Gesamt-RNA

Ein Ansatz mit 1 µg RNA (die noch genomische DNA enthielt), 2 µl 10x-Reaktionspuffer und 1 µl DNaseI (1U, Invitrogen) wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert für den Verdau der DNA. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA und einer Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.3 Amplifikation von DNA mittels PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden verschiedene thermostabile Polymerasen und optimierte Temperaturprofile verwendet. Bei allen PCR-Programmen ist am Anfang ein zusätzlicher Denaturierungsschritt (2 min bei 95 °C) und am Ende eine verlängerte Elongation (5 min) eingefügt worden.

3.3.1 Standard-PCR

Für die PCR von DNA-Fragmenten bis 2000bp wurde standardmäßig die Taq DNA Polymerase (5U/µl, QIAGEN) verwendet. Ein Reaktionsansatz von 20 µl enthielt 2 µl 10x PCR Puffer mit 15 mM MgCl₂, 1 µl 2,5 mM dNTP, 5 pmol je Primer, 20 ng bis 40 ng DNA-Template, und 0,5 U Taq DNA Polymerase. Folgend ist ein Beispiel für die Amplifikation von PCR-Fragmenten bis zu 1 kb angegeben.

Zyklus	1 - 34	
Denaturierung	95 °C	40 sec
Annealing	T_a	40 sec
Elongation	72 °C	1 min

T_a : Annealingtemperatur, die für jedes Primerpaar vorher ermittelt wurde

3.3.2 Standard-PCR für die genomweite Kopplungsanalyse

Für die 460 STR-Marker ist ein standardisierter PCR-Reaktionsansatz und ein PCR-Programm verwendet worden. Ein 10 μ l Reaktionsansatz enthielt 1 μ l 10x Puffer, 1 μ mol dNTPs, 3 pmol je Primer und 0,4 U *Taq* DNA Polymerase (5U/ μ l, QIAGEN).

Als PCR-Programm kam eine „Touch down“-Variante zur Anwendung:

Zyklus	1 - 2		3 - 4		5 - 6		7 - 37	
Denaturierung	94 °C	30 sec	94 °C	30 sec	94 °C	30 sec	94 °C	30 sec
Annealing	61 °C	45 sec	59 °C	45 sec	57 °C	45 sec	55 °C	45 sec
Elongation	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min

3.3.3 Amplifikation langer PCR-Produkte

Für PCR-Produkte, die größer als 2 kb waren, kamen verschiedene DNA-Polymerasengemische aus rekombinanter *Taq*-DNA-Polymerase und thermostabiler proof-reading DNA-Polymerase zur Anwendung. Combizyme[®] (InViTek), TaKaRa LA *Taq*[™] (TaKaRa) und Long PCR Enzyme Mix (Fermentas GmbH) wurden verwendet:

DNA-Polymerase	Combizyme [®] [μ l]	TaKaRa LA <i>Taq</i> [™] [μ l]	Long PCR Enzyme Mix [μ l]
10x Reaktionspuffer	2	5	5
5x Enhancer	4	0	0
DMSO	0	0	2
25 mM MgCl ₂	0,8	0	0
2,5 mM dNTPs	2	8	4
5 μ M Primer FW	0,4	5	10
5 μ M Primer RW	0,4	5	10
DNA-Polymerase	0,2	0,5	0,25
DNA-Templat	30 ng	150 ng	300 ng
Gesamtvolumen	20	50	50

Combizyme®

Die Combizyme®-DNA-Polymerase (4 U/ μ l, InViTek) wurde zusammen mit 10x Optipuffer III, 5x OptiZyme Enhancer und 50 mM MgCl₂ der Firma InViTek benutzt. Neben dem PCR-Programm für die Standard-PCR (siehe 3.3.1) wurde auch folgendes Programm verwendet:

Zyklus	1 - 6		7 - 12		13 - 19		22 - 26		27 - 33	
Denaturierung	95°C	30sec	95°C	30sec	95°C	30sec	95°C	30sec	95°C	30sec
Annealing	56°C	1min	56°C	1min	56°C	1min	56°C	1min	56°C	1min
Elongation	68°C	2,5min	68°C	2,8min	68°C	3,2min	68°C	3,3min	68°C	3,5min

TaKaRa LA Taq™

Die Polymerase TaKaRa LA Taq™ (5 U/ μ l, TaKaRa) wurde mit 10x LA PCR Buffer II -Puffer verwendet. Das PCR-Programm ist nachfolgend aufgeführt:

Zyklus	1 - 30	
Denaturierung	98 °C	10 sec
Annealing	60 °C	1 min
Elongation	68 °C	15 min

Long PCR Enzyme Mix

Der Long PCR Enzyme Mix (5 U/ μ l, Fermentas) kam mit dem 10x Long PCR Buffer mit 15mM MgCl₂ zur Anwendung.

Zyklus	1 - 10		11 - 35	
Denaturierung	94 °C	30 sec	94 °C	30 sec
Annealing	60 °C	45 sec	60 °C	45 sec
Elongation	68 °C	12 min	68 °C	12 min (+5 sec pro Zyklus)

3.3.4 Amplifikation GC-reicher DNA-Fragmente

Die Amplifikation GC-reicher DNA-Fragmente ist mit dem Advantage®-GC Genomic PCR Kit (BD Bioscience) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt worden. Der optimierte Reaktionspuffer mit DMSO und einem zusätzlichen Reagenz, GC-Melt (5 M), schwächen die Basenpaarung GC-reicher Sequenzen und destabilisiert DNA-Sekundärstrukturen, wodurch die PCR erleichtert wird.

Für die Optimierung der PCR-Bedingungen sind, wie vom Hersteller empfohlen, die GC-Melt-Endkonzentrationen 0,5 M, 1,0 M und 1,5 M getestet worden.

Zyklus	1 - 30	
Denaturierung	98 °C	30 sec
Annealing/ Elongation	68 °C	3 min

3.3.5 PCR-Bedingungen für die Analyse von *BMP10*, *Nkx2.5*, *ZASP* und *LMNA*

Die verwendeten PCR-Bedingungen für die Analyse der LVNC-Kandidatengene sind in der Tabelle 3.1 aufgeführt, wobei die Polymerase-Enzyme *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN) und Combizyme®-DNA-Polymerase (InViTek), im folgenden Taq bzw. Combi genannt, benutzt wurden.

Primer	5'→3' Oligosequenz	Anwendung	Länge [bp]	Enzym	T _a [°C]
BMP10 Ex1F	TGCACAAGTTTACACTAGGG	PCR/	661	Taq	55
BMP10 Ex1R	ACCTATATCATTTCCCATGC	Sequenzierung			
BMP10 Ex2F1	AAGCTTTGTGCATGGGAAGG	PCR/	1271	Taq	60
BMP10 Ex2R2	TCAAATCAACAGGGAGGTGG	Sequenzierung			
BMP10 Ex2R1	GTCCACTGGAAAAGCTATCC	Sequenzierung			
BMP10 Ex2F2	TGACAAGGAGAGGAAGGAGG	Sequenzierung			
Nkx2.5-Ex1-F	GCTGTGAGACTGGCGCTGCCACC	PCR /	496	Combi	57
Nkx2.5-Ex1-R	CCGGTGAAGGCGCGCGGCCAGCTC	Sequenzierung			*
Nkx2.5-Ex2-F	GCAGGACACAGTGGCCTCCACGAGG	PCR /	810	Combi	57
Nkx2.5-Ex2-R	CGAGAGTCAGGGAGCTGTTGAGG	Sequenzierung			*
Nkx2.5-Ex2e-F	GGCAGGACCAGACTCTGGAGCTGG	Sequenzierung			
Nkx2.5-Ex2e-R	GGCGTTATAACCGTAGGGATTGAGG	Sequenzierung			
ZASP-Ex01-F	TGAGTGCCCTCTCACTCAAC	PCR/	258	Taq	56
ZASP-Ex01-R	CTGAGAGGCTCAGAAAGGAC	Sequenzierung			
ZASP-Ex02-F	TTTCCTCAGGACCACCTTCC	PCR/	255	Taq	56
ZASP-Ex02-R	ATGCCACACCCAAACCTC	Sequenzierung			
ZASP-Ex03-F	TTGCTCTCTCCTCACCAGC	PCR/	221	Taq	56
ZASP-Ex03-R	AGCACTCCAGGAACCAGGG	Sequenzierung			
ZASP-Ex04a-F	TTTCAGGTCCACGCAGGAG	PCR/	353	Taq	60
ZASP-Ex04a-R	TGTTATATTGCCTCGGCTGG	Sequenzierung			
ZASP-Ex04aF1	GACGCGTGTGGCCTCTAAC	PCR/	322	Taq	58
ZASP-Ex04aR1	ATTGCCTCGGCTGGCTCG	Sequenzierung			
ZASP-Ex04b-F	CTTCTCCTCACTCGCCGAG	PCR/	319	Taq	56
ZASP-Ex04b-R	ACCACCTGACCAGGTCTCTG	Sequenzierung			
ZASP-Ex04bF1	CCTGAGGGCCAAGACCAGC	PCR/	216	Taq	55
ZASP-Ex04bR1	TGTGGAGAGCTGTATGTCCG	Sequenzierung			
ZASP-Ex07-F	GCCACCAATGGGCATGGAG	PCR/	346	Taq	62
ZASP-Ex07-R	TCCCTGGCTTCTGCAGTGC	Sequenzierung			
ZASP-Ex08-F	AGCAGCTTTCTTGTCTGTG	PCR/	182	Taq	60
ZASP-Ex08-R	CTTCCATGAGTGATGTGACC	Sequenzierung			
ZASP-Ex10-F	TCACAGGGTCTCTAGGCTC	PCR/	326	Taq	56
ZASP-Ex10-R	AGCTGGCCACAGGTAGACC	Sequenzierung			

Primer	5'→3' Oligosequenz	Anwendung	Länge [bp]	Enzym	T _a [°C]
ZASP-Ex11-F	AGCCTGCCTTGA CTG CAGG	PCR/	290	Taq	60
ZASP-Ex11-R	CAC TTCTTGGCTCTTGTGGC	Sequenzierung			
ZASP-Ex12a1-F	GGA ACTGGGAAGAATGAAT TCC	PCR/	360	Taq	56
ZASP-Ex12a2-R	TCATCTGTCACCCAGG GTGGAC	Sequenzierung			
ZASP-Ex12aSequF	GAATGAATTCCTGACACACC	Sequenzierung			
ZASP-Ex12c-F	TCACCTGTCCCCACCTACAC	PCR/	408	Taq	60
ZASP-Ex12c-R	CTCAGACTGTGGGCAAGCAC	Sequenzierung			
ZASP-Ex13-F	ATTCCAAGTTCTGGGAGCTG	PCR/	305	Taq	56
ZASP-Ex13-R	ATGGGATCCCACGATCTTGG	Sequenzierung			
ZASP-Ex14-F	TAGTCAAGCCCGCTCCCTC	PCR/	258	Taq	56
ZASP-Ex14-R	TTAGGCAGGAGTTAGTTCCC	Sequenzierung			
ZASP-Ex15-F	TTTGTCTTGGCTTTGGGTCC	PCR/	250	Taq	62
ZASP-Ex15-R	ATCTGGCTCCC ACTTCCCTC	Sequenzierung			
ZASP-Ex16-F	AAATCTGCTCATGCCCTGTG	PCR/	232	Taq	65
ZASP-Ex16-R	CAGAAGAAACATCAGCCTCC	Sequenzierung			
LMNA-Ex01-F	ACTCCGAGCAGTCTCTGTCTT	PCR/	571	Combi	56
LMNA-Ex01-R	CTTTGCCATAGTCTCCTCCCT	Sequenzierung			
LMNA-Ex02-F	CAACCTAATGCAAGGATGCC	PCR/	492	Taq	62
LMNA-Ex02-R	TAAATTCACTGTGGTAGATCCC	Sequenzierung			
LMNA-Ex03-F	TGTTTCCACATGTGTGAAGG	PCR/	479	Taq	56
LMNA-Ex03-R	AAATCAGAATTAGTTCTCTGG	Sequenzierung			
LMNA-Ex04-F	GCCAGCACTCAGCTCCCAG	PCR/	463	Taq	66
LMNA-Ex04-R	GTTGGGCATCACTGCTACAGC	Sequenzierung			
LMNA-Ex05-F	TTCTGGGGATCAGGCAGATG	PCR/	454	Taq	66
LMNA-Ex05-R	GTGTACAGAAACAGCACACAGG	Sequenzierung			
LMNA-Ex06-F	AAGCTCTGATTGCAGATCCTGG	PCR/	556	Taq	66
LMNA-Ex06-R	TGCGGCTCTCAGTGGACTCC	Sequenzierung			
LMNA-Ex07-F	GACATGGAGATCCACGCCTAC	PCR/	486	Taq	62
LMNA-Ex07-R	CAGGCTCACCCTGGTCCACC	Sequenzierung			
LMNA-Ex8/9-F	GAGAGGCCTCAATTGCAGGC	PCR/	560	Combi	62
LMNA-Ex8/9-R	GGTGGAGAAGTCTGGAGCCTG	Sequenzierung			
LMNA-Ex10-F	TTAGCTCCATCACCACAGAGG	PCR/	506	Taq	62
LMNA-Ex10-R	CAGACCCTTGTTCCACTGCTC	Sequenzierung			
LMNA-Ex11-F	GGCTCCTTGGGCACAGAACC	PCR/	552	Combi	67
LMNA-Ex11-R	GCTGTCTAGGACTCAGGCTGTG	Sequenzierung			
LMNA-Ex12-F	AGATGCTACCTCCCTTCTAGG	PCR/	526	Taq	62
LMNA-Ex12-R	TCAGGCACCATGTACAGGG	Sequenzierung			

Tabelle 3.1: PCR-Bedingungen für die Gene *BMP10*, *Nkx2.5*, *LDB3* und *LMNA*. Taq: Taq DNA Polymerase (*QIAGEN*), Combi: Combizyme[®] (*InViTek*), *Verwendung des speziellen Combizyme[®]-Programms (siehe 3.3.3)

3.3.6 Standard-PCR für die DHPLC-Analyse

Die Amplifikation der Exonbereiche und Exon-Intron-Grenzen des Gens *MYH7* mit der DNA-Polymerase AmpliTaq Gold[™] (5 U/ μ l, Applied Biosystems) ist größtenteils von Yu et al. übernommen worden [125]. Der 50 μ l PCR-Reaktionsansatz enthielt 5 μ l 10x PCR Gold Buffer (ohne MgCl₂), 3 μ l 25 mM MgCl₂, 20 pmol je Primer, 1 U DNA-Polymerase und 20 ng DNA-Template. Einige PCRs wurden neu optimiert und

teilweise sind die Bedingungen der Standard-PCR, wie unter 3.3.1, verwendet worden.

Die Primersequenzen zur Analyse der Gene *MYL2*, *MYL3*, *ACTC*, *TNNT2*, *TNNI3* und *TPM1* sind der Datenbank 'CardioGenomics' entnommen und an einigen Positionen der aktuellen Gensequenz angepasst worden. Für die PCRs wurde hauptsächlich Taq DNA Polymerase (5U/ μ l, QIAGEN) verwendet und nur in Einzelfällen auch AmpliTaq GoldTM (5 U/ μ l, Applied Biosystems) und Combizyme[®]-DNA-Polymerase (4 U/ μ l, InViTek).

3.3.7 PCR-Bedingungen zur Amplifikation des *MYH7*-Transkripts aus Blut

Aus 0,8 μ g cDNA eines Patienten ist der Bereich von Exon 7 bis Exon 14 des *MYH7*-Transkripts mit Hilfe der Standard-PCR mit Taq-Polymerase (QIAGEN) und 40 Zyklen amplifiziert worden (siehe 3.3.1). Aus diesem Reaktionsansatz wurden anschließend die Primer und dNTPs durch Verdau mit ExonucleaseI (10 U) und SAP (1 U) (Shrimp Alkaline Phosphatase) entfernt. Davon wurden 5 μ l unverdünnt für die innere PCR von Exon 8 bis 13 mit den gleichen Bedingungen verwendet. Nach der Amplifikation sind 8 μ l auf ein 2 %-iges Agarose-Gel (GelStar[®] gefärbt) aufgetragen worden.

Primer	5'→3' Oligosequenz	Länge [bp]
cMYH7-Ex7-F	ACCGCAGCAAGAAGGACCAGAGCC	676
cMYH7-Ex14-R	GCCAGTGCCCCAGTGGCATATATC	
cMYH7-Ex8-F	CCTTTGGCAATGCCAAGACC	583
cMYH7-Ex13-R	GCATATATCACCTGCTGGACATTC	

3.4 Reverse Transkription von RNA

Ein Ansatz mit 20 μ l RNA (ca. 1 μ g nach DNaseI-Verdau, siehe 3.2.3), 1 μ l 10 mM dNTP und 1 μ l 50 μ M Random-Hexamer-Primer wurde 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach einer schnellen Abkühlung im Eisbad wurden 6 μ l 5x-Reaktionspuffer, 1 μ l 0,1mM DTT und 1 μ l SuperscriptTMIII-Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben. Das Programm mit 5 Minuten 25 °C (Primer-Annealing), 50 Minuten 55 °C (Reverse Transkription) und 15 Minuten 70 °C (Inaktivierung des Enzyms) wurde im Thermocycler durchgeführt. Die cDNA ist im Anschluss bei -20 °C aufbewahrt worden.

3.5 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode [101] mit dem ABI PRISMTM BigDyeTM Terminator v1.1 Cycle Sequencing

RR-2500 Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die nicht eingebauten Primer und dNTPs des PCR-Ansatzes wurden vorher mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) und Exonuklease I bei 37 °C für 40 Minuten verdaut. Die anschließende Inaktivierung der Enzyme erfolgte bei 80 °C für 20 Minuten.

Für die Sequenzierreaktion wurden 30-60 ng PCR-Produkt, 5 pmol Primer, 1 μ l BigDye™ verwendet und mit ddH₂O auf 10 μ l aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Zyklus	1 - 26	
Denaturierung	95 °C	40 sec
Annealing	T _a	40 sec
Elongation	72 °C	4 min

Die ungebundenen dNTPs wurden anschließend durch Zentrifugation des Reaktionsansatzes durch Sephadex G50 (Amersham) nach Angaben des Herstellers entfernt.

Zur gereinigten Sequenzprobe wurde 8 μ l HiDi-Formamid (Applied Biosystems) gegeben und im ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (16 Kapillaren, Applied Biosystems) analysiert. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit den Programmen Sequencing Analysis (Applied Biosystems) und Sequencer (Gene Codes).

3.6 DHPLC-Analyse

3.6.1 Methode

Die DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) wurde mit dem Gerät WAVE®3500H und der dazugehörigen Navigator®-Software (Transgenomics) durchgeführt (siehe 1.4.2).

3.6.2 Bestimmung der Analysetemperatur und -bedingungen

Die Unterscheidung zwischen Homomeren und Heteromeren gleicher Länge setzt partiell denaturierende Bedingungen voraus. Bei einer Temperatur, bei der noch 75 bis 95 % des DNA-Fragments als Doppelstrang vorliegt, ist die Detektionsrate von Heteromeren bei 95 bis 100 % [51, 121].

Die Navigator®-Software beinhaltet ein Werkzeug zur Berechnung der optimalen Analysetemperatur. Diese stellt grafisch den Grad der Denaturierung in Abhängigkeit einer gegebenen Temperatur dar. Für den Fall, dass für eine Temperatur nicht der

gesamte Exonbereich eines Fragments die gewünschte Denaturierungsrate zeigte, sind zwei Analysetemperaturen, also zwei DHPLC-Läufe, verwendet worden.

Die DHPLC-Laufbedingungen, d.h. die Veränderung des Acetonitril-Gradienten, berechnete die Navigator[®]-Software automatisch.

3.6.3 Durchführung

Vor der DHPLC-Analyse wurden die PCR-Produkte denaturiert (5 min bei 95 °C) und langsam rehybridisiert (pro 30 sec um 1 °C niedriger) um zusätzliche heteromere Fragmente zu erhalten. Die Injektion und Analyse der einzelnen Proben unter den vorher ermittelten Bedingungen erfolgte mit der WAVE[®]-Anlage (Transgenomics) vollautomatisch.

Für die Auswertung wurden die Elutionskurven des PCR-Produkts von allen Indexpatienten verglichen. Proben mit einem abweichenden Profil wurden sequenziert und mit der DNA-Sequenz einer nicht auffälligen Probe verglichen.

3.7 DNA-Arbeiten

3.7.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration (DNA/ RNA) erfolgte spektrometrisch mit dem NanoDrop[®] ND-1000 Spektrometer (PeqLab) durch die Messung der Absorption bei 260 nm. Zusätzlich wurde auch die Absorption bei 280 nm gemessen, um den Grad der Proteinverunreinigung festzustellen. Als Kriterium für die Reinheit sollte der Quotient von Nukleinsäure und Protein (260 nm/280 nm) zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

3.7.2 Restriktionsverdau von DNA

Die Durchführung eines Restriktionsverdaus erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Dementsprechend wurden Enzym- und Puffermengen, sowie Reaktionstemperatur gewählt.

3.7.3 Agarosegel-Elektrophorese

Für die Auftrennung von DNA nach Restriktionsverdau oder PCR wurde je nach Fragmentlänge Agarosegele mit 0,6 % bis 2 % Agarose in 1x TTE-Puffer verwendet. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei 110 V für ca. 1,5 Stunden (Hoefer MaxTM HE99, SERVA). Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein 1 kb-Größenstandard (Fermentas)

oder für Long-Range-PCR-Produkte ein 10 kb-Größenstandard (Fermentas) verwendet. Die Visualisierung und Dokumentation der DNA-Banden erfolgte mit UV-Licht und dem E.A.S.Y.-System (Herolabs).

3.7.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegel

Die Aufreinigung einzelner DNA-Banden aus einem Agarosegel wurde mit dem NucleoSpin[®] Extract II-Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt.

Diese Methode wurde zur Sequenzierung einzelner Fragment in einem Bandenmuster benutzt. Die Sequenzierung erfolgte direkt danach oder nach vorheriger Klonierung in einen TA-Vektor (Invitrogen).

3.7.5 Ligation

PCR-Produkte wurden mit dem TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) bei 4 °C über Nacht in den mitgelieferten pCR[®]II-Vektor ligiert.

3.7.6 Transformation

Die Transformation eines Plasmids in den *E.coli*-Stamm DH5- α erfolgte nach der Standard-Hitzeschockmethode [100].

Danach sind 20 μ l und 100 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml), die mit 40 μ l X-Gal (20mg/ml) und 10 μ l IPTG (238mg/ml) überschichtet waren, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert worden.

3.7.7 Bakterienkultur

Die Anzucht einer *E.coli*-Flüssigkultur erfolgte in LB-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) in einem Schüttler bei 37 °C.

Auf Fest-LB-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) ausplattierte Bakterien wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.8 Expressionsstudien

Die Expression eines Gens in verschiedenen Geweben oder in den Leukozyten des Blutes wurde anhand der Transkriptmenge des Gens verglichen. Für die semi-quantitativen Expressionsstudien ist die Gesamt-RNA aus dem jeweiligen Gewebe isoliert und in cDNA umgeschrieben worden.

Die Umschreibung der RNA und die folgenden Schritte wurde mit allen zu vergleichenden Proben immer gleichzeitig durchgeführt.

Auswahl der Primer

Das Produkt der semi-quantitativen PCR von der cDNA sollte deutlich von einem PCR-Produkt der genomischen DNA unterschieden werden können und sehr leicht zu amplifizieren sein. Deshalb wurden die Primer so gewählt, dass zwischen Vorwärtsprimer und Rückwärtsprimer mindestens ein Intron und der Rückwärtsprimer im letzten kodierenden Exon lag. Desweiteren war das amplifizierte Fragment immer ungefähr 200bp lang.

Ermittlung der optimalen Zyklenzahl

Für die Expressionsstudie muss sich die DNA-Amplifikation im expotentiellen Bereich befinden. Zur Ermittlung der dafür optimalen Zyklenzahl ist mit einer bestimmten cDNA-Menge ein 200 μ l PCR-Großansatz pipettiert worden. Dieser Großansatz wurde dann auf 10 PCR-Tubes aufgeteilt, die nach 10 aufeinanderfolgenden Zyklen aus dem Thermocycler genommen und gekühlt wurden. Anschließend erfolgte die Auftrennung im 2% Agarosegel (DNA-Färbung mit GelStar[®]) und eine Fotodokumentation der unterschiedlichen Bandenstärken. Das digitale Bild wurde mit der Software 'TINA' (Tab. 3.3) ausgewertet. Dabei wird die Stärke der einzelnen Banden im Vergleich zum Background gemessen. Diese Werte wurden in ein halblogarithmisches Diagramm eingetragen, dessen x-Achse die jeweilige Zyklenzahl zeigte. Für die Auswertung und die Erstellung des Diagramms ist das Programm 'EXCEL' (Microsoft) benutzt worden. Der lineare Bereich in der graphischen Darstellung ist der Bereich der expotentiellen Amplifikation während der PCR. Aus diesem Abschnitt sind 2 verschiedene Zyklenzahlen für die weiteren Versuche verwendet worden. Die cDNA-Menge wurde beibehalten.

Normalisierung der cDNA-Mengen

Für die nachfolgenden Expressionsstudien sind die zu vergleichenden cDNA-Proben vorher auf die gleiche Konzentration gebracht worden. Diese Normalisierung wurde durch Angleichung von PCR-Produkten der 28SrRNA erreicht. Dabei erfolgte die Auswertung der Bandenstärke nach 3 unterschiedlichen Zyklenzahlen in der expotentiellen Phase mit den Programmen 'TINA' und 'EXCEL', wie oben beschrieben.

Expressionsvergleich durch semi-quantitative RT-PCR

Der Expressionsvergleich mit semi-quantitative PCR erfolgte unter Verwendung der normalisierten cDNA von Gesamt-Blut, von humanem Gewebe (DB Bioscience) oder von Ratten-Herzgewebe. Für jede Probe wurden ein doppelter Ansatz geteilt und PCRs mit 2 verschiedenen Zyklenzahlen im expotentiellen Bereich der jeweiligen Fragmentamplifikation durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden auf ein 2 %-iges Agarosegel (DNA mit GelStar[®] gefärbt) aufgetragen und nach dem Elektrophoreselauf das digitale Bild mit der Software 'TINA' ausgewertet (wie oben beschrieben). Die Werte der Bandenstärke ist dann mit den anderen Proben verglichen worden.

3.9 Southern-Blot-Hybridisierung

Southern Blot-Herstellung

Für die Herstellung eines Southern-Blots ist genomische DNA eines Individuums mit 7 verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten worden. Je 10 μg DNA wurde mit BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, SacI und XbaI über Nacht bei 37 °C verdaut. Die Auftrennung der geschnittenen DNA nach dem Molekulargewicht erfolgt in einem 0,8%-igen Agarosegel. Um die DNA-Fragmente zu denaturieren, wurde das Gel zweimal 20 Minuten in Denaturierungslösung und dann zweimal 20 Minuten in Neutralisierungslösung equilibriert. Die DNA war so vorbereitet für die Übertragung auf eine Nylon-Transfer-Membran (HybondTM-N+, Amersham) durch Kapillartransfer über Nacht. Die Quervernetzung erfolgte durch UV-Licht von 1200 μJ (UV Stratalinker[®]1800, Stratagene).

Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Als DNA-Sonden wurden PCR-Produkte von der zu untersuchenden cDNA oder der genomischen DNA verwendet. Diese doppelsträngigen DNA-Sonden wurden nach der Methode von Feinberg und Vogelstein mit dem MegaprimeTM DNA Labelling System (Amersham Bioscience) radioaktiv markiert. Dazu wurde die DNA denaturiert und mit einem Gemisch von Nonanukleotiden hybridisiert, die als Primer für die Synthese durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase in Gegenwart von $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP und unmarkierten dCTP, dGTP und dTTP dienten [29, 30]. 30 ng denaturiertes PCR-Produkt wurde zum Reaktionsgemisch aus 5 μl Reaktionspuffer, 5 μl Primer-Mix, je 4 μl dCTP, dGTP, dTTP und $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP und 2 μl Klenow-Enzym. Dieser 50 μl Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung

der markierten DNA-Sonde von nicht eingebauten dNTPs erfolgte mit MicroSpinTM G-25 Columns (Amersham) nach den Angaben des Herstellers. Denaturiert wurde die DNA-Sonde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C und anschließend sofortiges Lagern auf Eis.

Southern-Blot-Hybridisierung

Für die Hybridisierung des Southern-Blots mit einer DNA-Sonde wurde die Membran zuerst für eine Stunde in 50 ml Hybridisierungslösung mit 1 mg denaturierter Heringssperma-DNA bei 62 °C prähybridisiert, anschließend die gereinigte radioaktiv markierte DNA-Sonde denaturiert zugegeben und über Nacht bei 62 °C hybridisiert. Am nächsten Tag erfolgte das Entfernen der nicht gebundenen DNA-Sonden durch mehrere Waschschrte: 1. zweimal bei Raumtemperatur mit Waschlösung I durch Ausspülen der Hybridisierungsröhre mit enthaltener Membran, 2. 10 min bei 62 °C in Waschlösung I, 3. 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung II. Das radioaktiv markierte Bandenmuster wurde durch Belichtung eines Röntgenfilms oder FUJI Imaging Plate type BAS-III (FUJI Photo Film Co., LTD.) detektiert.

Das Entfernen der DNA-Sonde von der Membran (Strippen) wurde durch 2-minütiges Kochen in 0,5%-iger SDS-Lösung erreicht.

Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH	20x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ -citrat pH 7,0
Neutralisationslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M Tris pH 7,0	Waschlösung I:	2x SSC 0,05 % SDS
Hybridisierungslösung:	1x SSC 0,2 % SDS 1x Denhards-Lsg. 5 % Dextransulfat	Waschlösung II:	0,2x SSC 0,2 % SDS

3.10 Bestimmung des Karyotyps und Array-CGH

Bestimmung des Karyotyps

Die Bestimmung des Karyotyps, also die Chromosomenanzahl und die Anordnung der Chromosomenbanden im Zellkern, wurde nach der Standardmethode mit GTG-gefärbten Banden durchgeführt [1].

Array-CGH

Eine Weiterentwicklung der ‚Vergleichenden Genomischen Hybridisierung‘ (Comparative Genomic Hybridization, CGH) ist die Array-CGH, bei der Tausende von Sonden-BAC-Klonen auf einen Chip aufgebracht sind. Der verwendete 32K-Chip hat ca. 32000 BAC-Klone, deren Hybridisierungsstellen genomweit verteilt sind [59].

Grundlegende Schritte dieser Analyse sind: 1. Die genomische DNA eines Patienten und einer gesunden Kontrolle werden mit verschiedenen Farben gelabelt (Cy3 und Cy5) 2. Kompetitive Hybridisierung der markierten DNA auf den 32K-Chip und 3. Auswertung und graphische Darstellung mit verschiedenen Analyseprogrammen.

3.11 Phänotypisierung der Indexpatienten

LVNC-Indexpatienten sind nicht verwandte Einzelindividuen, bei denen nach körperlicher Untersuchung, EKG und 2D-Echokardiographie eine ‚Linksventrikulären Non-compaction‘ des Myokards festgestellt wurde. Die diagnostischen Parameter für isolierte LVNC sind dabei angewendet worden (siehe 1.2.1). Das bedeutet, dass neben der starken Trabekularisierung des Myokards keine weiteren klinischen Veränderungen, z. B. angeborene Herzfehler, zu finden sind. Diese Auswahl der Erkrankung wurde getroffen, um nur die Ursache dieser speziellen Anomalie zu untersuchen.

3.12 Kopplungsanalyse

3.12.1 Phänotypisierung von Familienmitgliedern

Die klinische Evaluierung der Mitglieder der Familie LVNC-105 wurde im Universitäts-spital Zürich (Schweiz) durchgeführt. Auf Grundlage von den Befunden der körperlichen Untersuchung, des EKGs und der 2D-Echokardiographie erfolgte die Diagnosestellung der einzelnen Individuen. Dabei sind die Kriterien für LVNC von Jenni et al. angewendet worden (siehe 1.2.1). Die Begutachtung wurde von zwei unabhängigen Ärzten durchgeführt.

3.12.2 Genotypisierung

Verwendung von STR-Markern

Für die genomweite Kopplungsanalyse wurde das Mikrosatellitenmarkerset ‚Weber Human Screening Set, Version 9‘ (Marshfield Institute) verwendet. Es wurde durch einzelne STR-Marker aus der Marshfield Genetic Map ergänzt, um die Abstände der

Marker zu optimieren. Dabei waren die Lokalisation und eine möglichst hohe Heterozygotie bei der Auswahl entscheidend. Der durchschnittliche Abstand betrug genomweit 10 cM.

Analyse der Genotypen

Die Amplifikation der STR-Marker mittels PCR von der genomischen DNA der Familienmitglieder wurde mit standardisierten Bedingungen durchgeführt (siehe 3.3.2). Die Auftrennung erfolgte durch Kapillarelektrophorese (ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer, Applied Biosystems) und die Auswertung mit der Software GeneMapper®v3.5 (Applied Biosystems).

3.12.3 Kopplungsanalyse

Die Wahrscheinlichkeit der Kopplung eines STR-Markers mit dem Krankheitsgen wurde mit speziellen Computerprogrammen berechnet.

Vor den Kalkulationen erfolgte eine Überprüfung der Genotyp-Daten auf Fehler und Widersprüchlichkeiten in der Vererbung mit dem Programm 'PedCheck' [79]. Für die anschließende Bestimmung der Kopplung wurde der LOD-Wert (logarithm of the odds, auch z-Wert) als Kriterium herangezogen und Zwei-Punkt- und Mehrpunkt-Analysen durchgeführt.

Bei der Zwei-Punkt-Analyse wird die Wahrscheinlichkeit (Likelihood, L), dass ein bestimmter STR-Marker mit der Erkrankung gekoppelt ist (mit einer Rekombinationshäufigkeit θ), verglichen mit der Wahrscheinlichkeit einer Nichtkopplung (mit einer Rekombinationshäufigkeit von 0,5). Der LOD-Wert z ist der dekadische Logarithmus des Quotienten beider Wahrscheinlichkeiten. Die Berechnung der LOD-Werte, unter Verwendung der θ -Werte 0,001, 0,05, 0,10, 0,20, 0,30 und 0,40, erfolgte mit dem Programm MLINK (LINKAGE Package, [62]) nach folgender mathematischer Berechnung:

$$\text{LOD-Wert} = z(\theta) = \log_{10}(L(\theta)/L(\theta=0,5))$$

L = Wahrscheinlichkeit (likelihood)

x = θ mit $0,00 \leq \theta \leq 0,49$

Bei einem LOD-Wert ≥ 3 geht man davon aus, dass eine Kopplung vorliegt, weil die Wahrscheinlichkeit $1000(=10^3)$ zu 1 ist. Ein LOD-Wert ≤ -2 wird eine Kopplung ausgeschlossen, da eine Nichtkopplung 100mal wahrscheinlicher ist.

Die Mehrpunkt-Analyse dient der Bestimmung der chromosomalen Anordnung verschiedener gekoppelter Loci. Ausgehend von den Ergebnissen der Zwei-Punkt-Analyse,

also der Nähe des Krankheitsgene zu einem bestimmten STR-Marker, kann mit dieser Analyse die Wahrscheinlichkeit berechnet werden, mit der das Krankheitsgen innerhalb einer vorgegebene Markerkarte einem der Abschnitte zwischen zwei STR-Markern zuzuordnen ist. Die Berechnung der möglichen Lokalisation des Krankheitsgens wurde mit dem Programm SIMWALK2 2.82 durchgeführt [111]. Die Berechnungen der LOD-Werte erfolgten parametrisch unter der Annahme eines autosomal-dominanten Erbganges.

3.13 Präparation von Rattenorganen

Für die Expressionsstudien im embryonalen Herzen wurde präpariertes Gewebe von WISTAR-Ratten (Charles-River-GmbH, Deutschland) verwendet. Die Haltung und Tötung der Ratten war vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LaGetSi) genehmigt (Anzeigenummer: T 0141/06).

3.13.1 Präparation von Organen adulter Ratten

Die Tötung einer Ratte erfolgte durch eine überdosierte Isofloran-Narkose und anschließendes Dekapitieren. Danach wurde die Präparation von Gewebe durchgeführt und 3 bis 10 mm³ Gewebestücke in Kryoröhrchen sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.13.2 Präparation von fetalen Rattenherzen

Verpaarung der Ratten

Zur Verpaarung wurden eine männliche und 2 weibliche Ratten zusammen in einen Käfig gesetzt. Da das Alter der Rattenembryonen für die weitere Analyse bekannt sein musste, wurde durch tägliche Kontrolle des Vaginalpfropfs (plug-check) Befruchtungszeitpunkt festgestellt.

Präparation von fetalen Rattenherzen

Die Tötung einer trächtigen Ratte erfolgte ebenfalls durch eine überdosierte Isofloran-Narkose und anschließendes Dekapitieren. Nach der Freilegung der Embryonen wurde die Präparation der embryonalen Herzen in PBS-Lösung durchgeführt. In einem Kryoröhrchen wurden drei Herzen zusammen sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.14 Bioinformatische Methoden

3.14.1 Datenbanken

Die für diese Arbeit verwendeten Datenbanken sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Datenbanken	Homepage
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
Marshfield Institut	http://research.marshfieldclinic.org
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu
GeneCards	http://www.genecards.org/index.shtml
CardioGenomics	http://cardiogenomics.med.harvard.edu

Tabelle 3.2: Verwendete Datenbanken.

3.14.2 Software

Für diese Arbeit ist unter anderem folgende Software verwendet worden:

Name	Verwendung	Hersteller
TINA 2.0	Bildanalyse	University of Sheffield, UK
FastPCR	Primerdesign	University of Helsinki, FIN
Sequencing Analysis Version 5.1.1	Sequenzauswertung	Applied Biosystems
Sequencher	Sequenzauswertung	Gene Codes Corporaton
DS Visualizer v1.7	Proteinmodell	Accelrys, Inc., USA
GeneMapper v3.5	Genotypauswertung	Applied Biosystems
NanoDrop 3.1.2	Spektrometer-Software	peqlab Biotechnologie GmbH

Tabelle 3.3: Verwendete Software.

3.14.3 Enhancer Element Locator

Das Computerprogramm 'Enhancer Element Locator' (EEL) ist von Hallikas et al. entwickelt worden, um Enhancer-Elemente im Säugergenom in silico identifizieren zu können [39]. Der lokale Alignmentalgorithmus des EEL ermittelt und bewertet die Bündelung, die Affinität (der DNA-Sequenz zum Transkriptionsfaktor (TF)) und die Konservierung von TF-Bindungsstellen zwischen zwei Spezies. Dabei wird die DNA-Sequenz nicht direkt verwendet, weil Sequenzvariationen die gleiche Affinität zu Transkriptionsfaktoren haben können. Eine der Grundlagen des Programms ist die Affinität von TF zu verschiedenen Oligonukleotidsequenzen. Die Bestimmung dieser Affinitäten

ist erst für entwicklungsbiologisch relevante Transkriptionsfaktoren vorgenommen worden [39].

Der 'Enhancer Element Locator' (EEL) ist ein online-Programm. Unter http://sysdb.cs.helsinki.fi/u/tkt_bsap/EELweb/ ist die Eingabeoberfläche zu finden. Für die Benutzung muss für jedes Gen die Ensembl-Gene-ID und verschiedene Parameter eingegeben werden. Alle Analyse wurden mit der gleichen Voreinstellung durchgeführt: Minimum Score = 300, maximale Länge = 2000 bp, Vergleich von Mensch (NCBI34) und Maus (NCBIM32) und Verwendung aller durch das Programm vorgegebenen TF-Bindungsstellen.

3.14.4 Ermittlung hoch-konservierter DNA-Bereiche

Die Ermittlung hoch-konservierter DNA-Bereiche im krankheitsassoziierten Lokus wurde nach dem Protokoll von Bejerano et al. mit dem UCSC Genome Browser durchgeführt [11]. Unter Einbeziehung der Ergebnisse der Kopplungsanalyse und den empfohlenen Filtereinstellungen, z. B. das Herausfiltern von kodierende Regionen, verglich die Datenbank die Sequenzen verschiedener Spezies, bewertete die Ergebnisse für weitergehende Analysen und stellt die Angaben zu den höchst-konservierten Bereichen tabellarisch dar.

3.14.5 Endeavour

Die Priorisierung der Kandidatengene im krankheitsassoziierten Lokus führt die Software 'Endeavour' auf Grund von Informationen zu bereits bekannten Krankheitsgenen durch [3]. Dabei erfolgt die Priorisierung im Gegensatz zu bisherigen Herangehensweisen auf Grundlage von mehreren verschiedenartigen Datenquellen. Dazu zählen unter anderem EntrezGene, BLAST, Gene Ontology und InterPro. Diese enthalten Daten zur Literatur, Sequenzähnlichkeiten, Funktionen, Proteindomänen, Expression, Protein-Protein-Interaktionen und/ oder einer Pathway-Zugehörigkeit. Die Ergebnisse werden tabellarisch und auch graphisch dargestellt.

Der mit der Erkrankung gekoppelte genomische Lokus wurde durch Nennung der begrenzenden STR-Marker eingegeben. Um zu sehen, wie robust die Ergebnisse der Priorisierung sind, wurden verschiedene LVNC-Kandidatengene und auch unterschiedliche Kombinationen von ihnen als Grundlage für die Berechnung eingegeben.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Phänotypische Charakterisierung der Familie LVNC-105

Die verwandtschaftlichen Beziehungen der Individuen der Familie LVNC-105 wurden in einem Stammbaum grafisch dargestellt (Abb. 4.1). Er umfasst 46 Individuen in 4 Generationen. 23 genetisch verwandte Familienmitglieder sind klinisch untersucht und die Diagnosen auf Grundlage der Kriterien für LVNC (siehe 1.2.1) gestellt worden (Tab. 4.1). In der Doppler-Echokardiographie wurde bei 9 Individuen (III/3, III/5, III/11, IV/1, IV/3, IV/6, IV/7, IV/8, IV/9) eine 'Linksventrikuläre Noncompaction' diagnostiziert. Das linksventrikuläre Myokard ist verdickt und besteht aus zwei Schichten. Die nicht kompakte endokardiale (innere) Schicht ist dicker als die epikardiale (äußere) Schicht mit einem Verhältnis ≥ 2 und besteht aus hervortretenden Trabekeln und tiefen Einbuchtungen (Rezessi). Die Patienten III/7, III/13 und IV/12 erfüllen die Kriterien nicht vollständig, weil das Verhältnis der Herzmuskelschichten kleiner als 2 ist. 2 Patienten (III/7 und III/12) haben eine schwache Pulmonalklappenstenose und 5 Patienten einen milden Mitralklappenprolaps. Das Familienmitglied IV/16 zeigt keine LVNC, aber einen kleinen Vorhofseptumdefekt und eine milde Pulmonalklappenstenose. Die anderen untersuchten Familienmitglieder sind als gesund eingestuft worden.

Die Erkrankung wird in der Familie LVNC-105 direkt an die folgende Generation weitergegeben, an männliche wie auch an weibliche Kinder und es traten 3 Vater-zu-Sohn-Vererbungen auf. Die LVNC folgt in dieser Familie somit einem autosomal-dominanten Erbgang (Abb. 4.1).

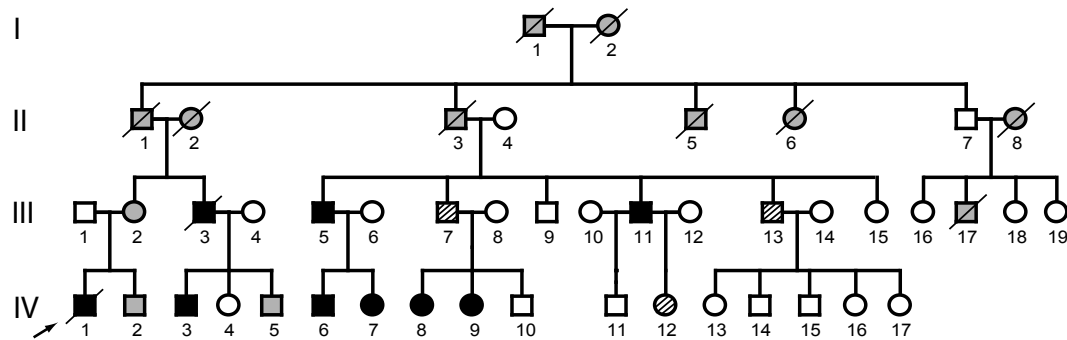


Abbildung 4.1: Stammbaum der Familie LVNC-105. Quadrat: männlich, Kreis: weiblich, ausgefüllt: betroffen, leer: nicht betroffen, schraffiert: unbestimmt, durchgestrichen: verstorben.

ID	Alter Y	LVED cm	LV- EF/FS %/%	LVED/ KOF cm/m ²	Seite v. Non- comp.*	Regionale Hypo- kinesie	Ratio nc/c \geq 2/1 ◇	Kommentar
III-3	47	6,3	30/17	...	3	Y	Y	HI †
III-5	48	5,9	42/29	3,0	3	Y	Y	HI; KS; IDC
III-7	45	5,3	59/42	2,9	2	N	N	PS min, PI min, MKP
III-11	47	6,2	44/27	3,2	2	Y	Y	MKP
III-13	50	5,6	.../30	2,8	1	N	N	PS min, PI 1, MKP
IV-1	18	6,6	.../33	...	3	Y	Y	plötzl. Herztod †
IV-3	23	5,6	.../29	...	1	Y	Y	MKP
IV-6	12	4,9	57/43	3,7	3	Y	Y	
IV-7	14	4,8	73/40	3,6	3	Y	Y	
IV-8	18	5,7	55/28	3,3	2	Y	Y	PI 1
IV-9	16	5,1	59/31	3,2	2	Y	Y	PI min, MKP
IV-12	19	4,0	56/33	2,6	2	N	N	

Tabelle 4.1: Klinische Daten der betroffenen Mitglieder der Familie LVNC-105. *nicht-kompaktierte Segmente, Abschnitte: Apex=1; Apex, midventr. Wand=2; Apex, midventr. und basale Wand=3; † gestorben; ◇ Verhältnis nicht-kompaktiertem/kompaktiertem Myokard; LVED - linksventrikulärer enddiastolischer Diameter; KOF - Körperoberfläche; LV-EF/FS - linksventrikuläre Ejektionsfraktion/fraktionelle Verkürzung des Herzmuskels; HI - Herzinsuffizienz; MKP - Mitralklappenprolaps; KS - kardiogener Schock; PS - Pulmonalstenose; PI - Pulmonalklappeninsuffizienz; ICD - intrakardialer Defibrillator.

4.2 Genetische Charakterisierung der Familie LVNC-105

4.2.1 Bestimmung des Karyotyps

Die Bestimmung des Karyotyps, also die Chromosomenanzahl und die Anordnung der Chromosomenbanden in einem Zellkern, und die Array-CGH wurden in Kooperation mit der medizinischen Genetik der Charité (Campus Virchow-Klinikum) durchgeführt.

Die Untersuchung der Metaphase-Chromosomen zeigte bei dem Patienten IV/3 einen normalen Karyotyp von 46 Chromosomen mit 450 GTG-Banden. Die Bestimmung des Karyotyps einer erkrankten Person ist aussagekräftig für die ganze Familie,

da alle Betroffenen dieselbe Veränderung haben.

4.2.2 Array-CGH

Mit einer Array-CGH ist es möglich, kleinere chromosomale Veränderungen zu finden, die nicht bei der Bestimmung des Karyotyps zu sehen sind.

Die Auswertung der genomweiten Array-CGH von zwei betroffenen Familienmitgliedern (IV/3 und III/11) zeigte keine signifikanten Mikrodeletionen oder -duplikationen von chromosomalen Abschnitten (Abb. 4.2). Der verwendete 32k-Chip hat eine durchschnittliche Auflösung von 70 kb. Somit sind Veränderungen, die größer als die Auflösung sind, in dieser Familie als Erkrankungsursachen ausgeschlossen.

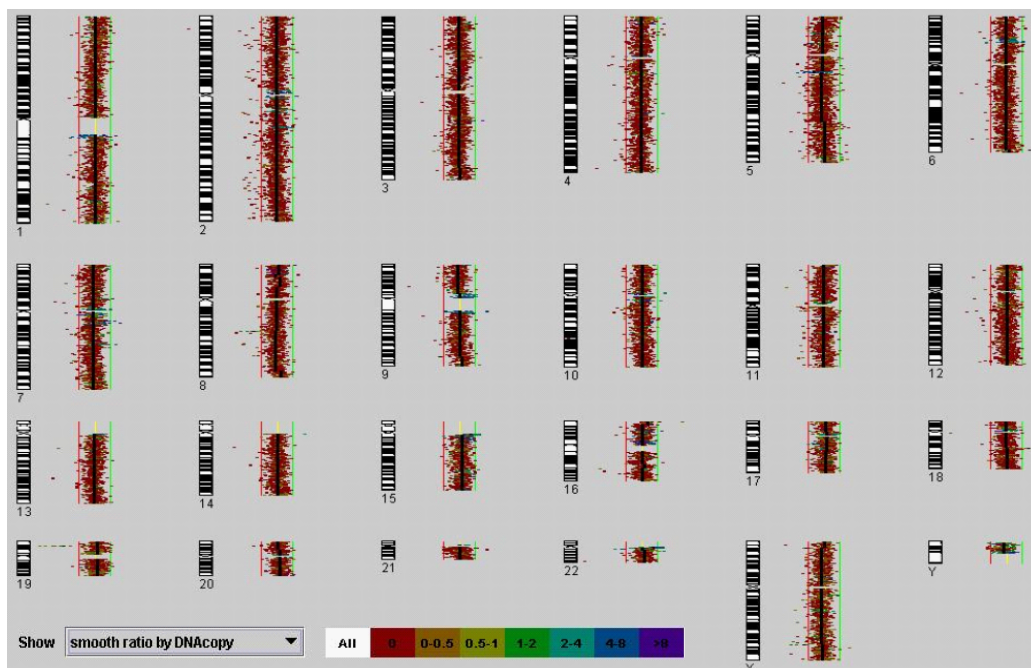


Abbildung 4.2: Ergebnis der Array-CGH des Patienten III/11. Als signifikante Veränderungen gelten Abweichungen von mindestens drei benachbarten BAC-Klonen über die Grenzwerte (rote bzw. grüne Linie). Die Farbkodierung (alle Farben abweichend von Rotbraun-Ton, z.B. Türkis oder Blau) zeigt zudem an, wenn die BACs segmentale Duplikationen enthalten, dies ist ein Hinweis auf Polymorphismen.

4.2.3 Analyse der Kopplung zu bekannten LVNC-, DCM- und HCM-Loci

Es wurden bereits Mutationen in verschiedenen Genen (*LDB3*, *LMNA*, *DTNA*, *TAZ*) bei LVNC-Patienten gefunden [120, 40, 46, 15]. Um zu untersuchen, ob in der Familie LVNC-105 eines der Gene krankheitsassoziiert ist, wurden die *LDB3*-, *LMNA*- und

DTNA-Loci auf Kopplung mit der Erkrankung in der Familie untersucht. Es konnte jedoch kein Haplotyp gefunden werden, der in der Familie mit der Erkrankung koregriert. *TAZ* wurde nicht berücksichtigt, weil es auf dem X-Chromosomen liegt und kein autosomal-dominante Vererbungsmuster zeigen würde.

Auf Grundlage publizierter Ergebnisse, dass Mutationen in den gleichen Genen verschiedene Kardiomyopathien (HCM und DCM) verursachen können, ist es möglich, dass eine Veränderung in einem dieser Gene auch für die Herzmuskelerkrankung LVNC verantwortlich sein kann [75, 40, 76]. Um das zu überprüfen, wurden alle bisher bekannten HCM- und DCM-Loci auf Kopplung mit der Vererbung von LVNC in der Familie LVNC-105 getestet (Tab. 4.2). Für diese Analyse wurde die genomische DNA von 10 betroffenen und 11 gesunden Familienmitgliedern verwendet (ohne die Kinder von III/13). Damit standen 17 informative Meiosen zur Verfügung. Die Untersuchung der Kopplung erfolgte durch eine Genotypbestimmung der Personen mit einer fluoescenzmarkierter PCR von STR-Markern, die sehr dicht neben oder in bekannten Genen oder im Locus lagen. Bei keinem der untersuchten Loci konnte eine Kopplung festgestellt werden, da Rekombinationsereignisse eine gemeinsame Vererbung der Erkrankung und eines bestimmten Haplotyps an dieser chromosomalen Stelle ausschließen. Alle X-chromosomalen Gene wurden nicht getestet, weil die Vererbung der Erkrankung in der Familie LVNC-105 eindeutig nicht an Geschlechtschromosomen gebunden ist.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die 'Linksventrikuläre Noncompaction' in der Familie LVNC-105 auf einer bisher unbekannten genetischen Ursache beruht.

4.3 Genomweite Kopplungsanalyse in der Familie LVNC-105

Um den neuen, unbekannten krankheitsassoziierten Locus zu finden, wurde eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Dafür sind die Genotypen von 22 Familienmitgliedern, wie in Abschnitt 4.2.3, mit 460 genomweit verteilten polymorphen STR-Markern ermittelt worden. STR-Marker auf den Geschlechtschromosomen kamen nicht zur Anwendung, da die Vererbung einem autosomal-dominanten Erbgang folgt und nicht an X- oder Y-Chromosom gebunden ist. Der Abstand zwischen den STR-Markern betrug maximal 11cM (Marshfield map, NCBI).

Basierend auf der genotypischen Charakterisierung der Familie LVNC-105 mit den 460 STR-Markern wurde eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Für die statistische Kalkulation standen 17 informative Meiosen zu Verfügung.

Das Ergebnis der Zwei-Punkt-LOD-Wert-Berechnung zeigte nur bei dem STR-Marker D11S1981 auf Chromosom 11p15 einen Wert größer als 3 (Abb. 4.3, Seite 40).

Gen	Chromosom	Kardiomyopathie	Referenz
<i>LMNA</i>	1q21.3	LVNC, DCM	[40, 16, 28]
<i>LDB3</i>	10q22.2-q23.3	LVNC, DCM	[120]
<i>DTNA</i>	18q12.1-q12.2	LVNC	[46]
<i>MYH6, MYH7</i>	14q11-12	DCM, HCM	[53, 78, 20]
<i>TTN</i>	2q31	DCM, HCM	[34, 104]
<i>TNNT2</i>	1q32	DCM, HCM	[53, 74]
<i>ACTC</i>	15q14	DCM, HCM	[85, 82]
<i>TPM1</i>	15q22	DCM, HCM	[84, 54]
<i>DES</i>	2q35	DCM	[64]
<i>SGCD</i>	5q33-34	DCM	[9]
unbekannt	9q13-22	DCM	[61]
unbekannt	10q21-23	DCM	[18]
unbekannt	2q14-22	DCM	[52]
unbekannt	3p22-25	DCM	[83]
unbekannt	6q23	DCM	[69]
<i>MYL3</i>	3p21	HCM	[63]
<i>MYL2</i>	12q23-24	HCM	[32]
<i>TNNI3</i>	19q13.4	HCM	[78]
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	HCM	[78]

Tabelle 4.2: Liste der in der Familie LVNC-105 auf Kopplung untersuchten bereits bekannten LVNC-, DCM- und HCM-Loci.

Die benachbarten STR-Marker der Kopplungsanalyse, D11S1999 und ATA34E08, hatten einen LOD-Wert nahe 0. Für alle STR-Marker außerhalb dieses Lokus waren die Zwei-Punkt-LOD-Werte unter 2.

4.3.1 Feinkartierung auf Chromosom 11p15

Die Ergebnisse der genomweiten Kopplungsanalyse begrenzen das krankheitsassoziierte Intervall distal und proximal von D11S1981 durch Rekombinationsereignisse bei den STR-Marker D11S1999 (III/13) und ATA34E08 (IV/3, IV/8). Das durch sie gekennzeichnete Intervall ist 15,8 cM groß. Um den krankheitsassoziierten Bereich auf Chromosom 11p15 weiter einzuengen, wurden weitere hoch polymorphe STR-Marker für eine Feinkartierung verwendet (Marshfield map, NCBI). Da in einem Teilabschnitt des Intervalls in der Marshfield-Genkarte kein STR-Marker lag, wurden die Contigs dieses genomischen Bereiches in der NCBI-Datenbank nach $(CA)_n$ -Elementen durchsucht. Ein solches Element mit 17 CA-Wiederholungen wurde unter der Bezeichnung CA-19.205 mit einbezogen.

Neben den 22 Personen der genomweiten Kopplungsanalyse wurden die 5 Kinder der partiell betroffenen Person III/13 in die Analyse mit eingeschlossen, um durch Rekombinationen in mehr Individuen das Intervall möglichst weit einzuengen zu können.

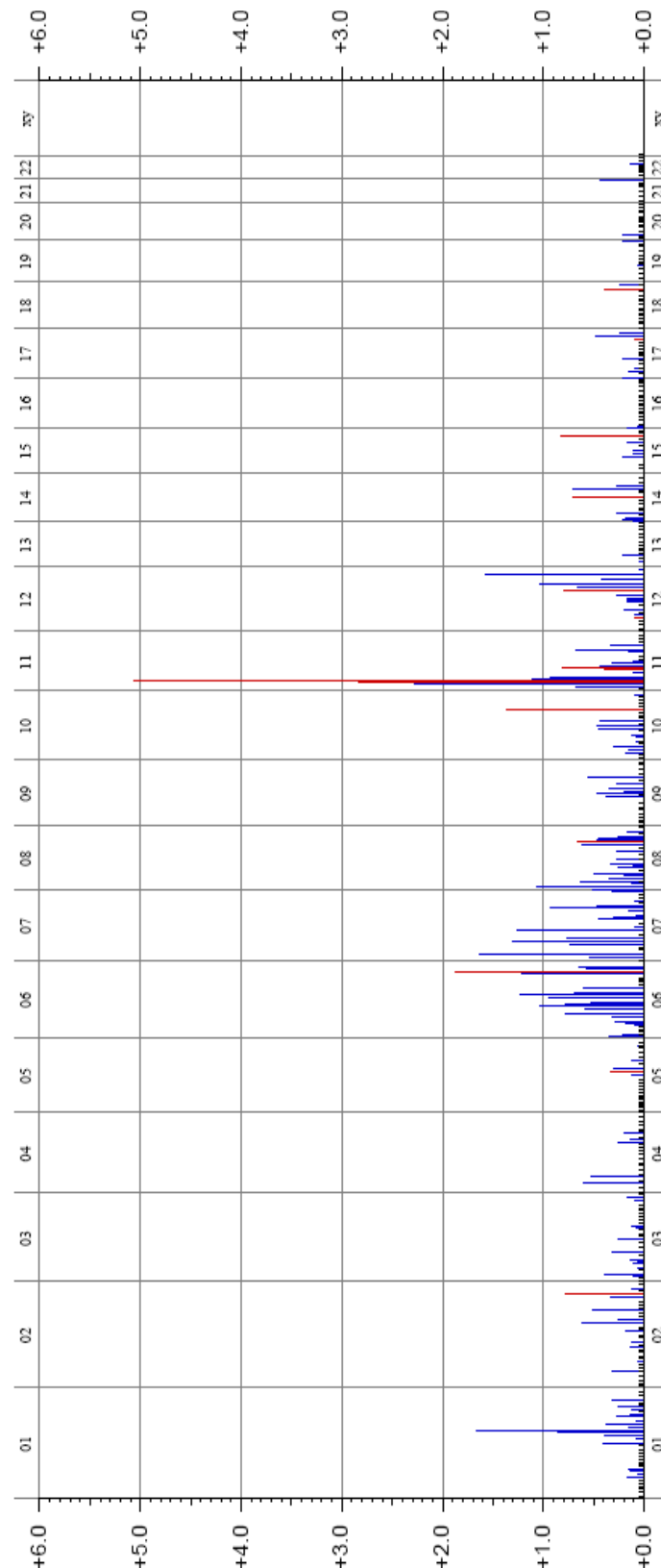


Abbildung 4.3: Grafik der genomweiten Zwei-Punkt-LOD-Wert-Analyse mit Feinkartierungs-STR-Markern der Familie LVNC-105. Die Farbe rot zeigt an, dass an dieser Stelle keine Rekombination in der Vererbung ist; bei blau gibt es mind. eine Rekombination.

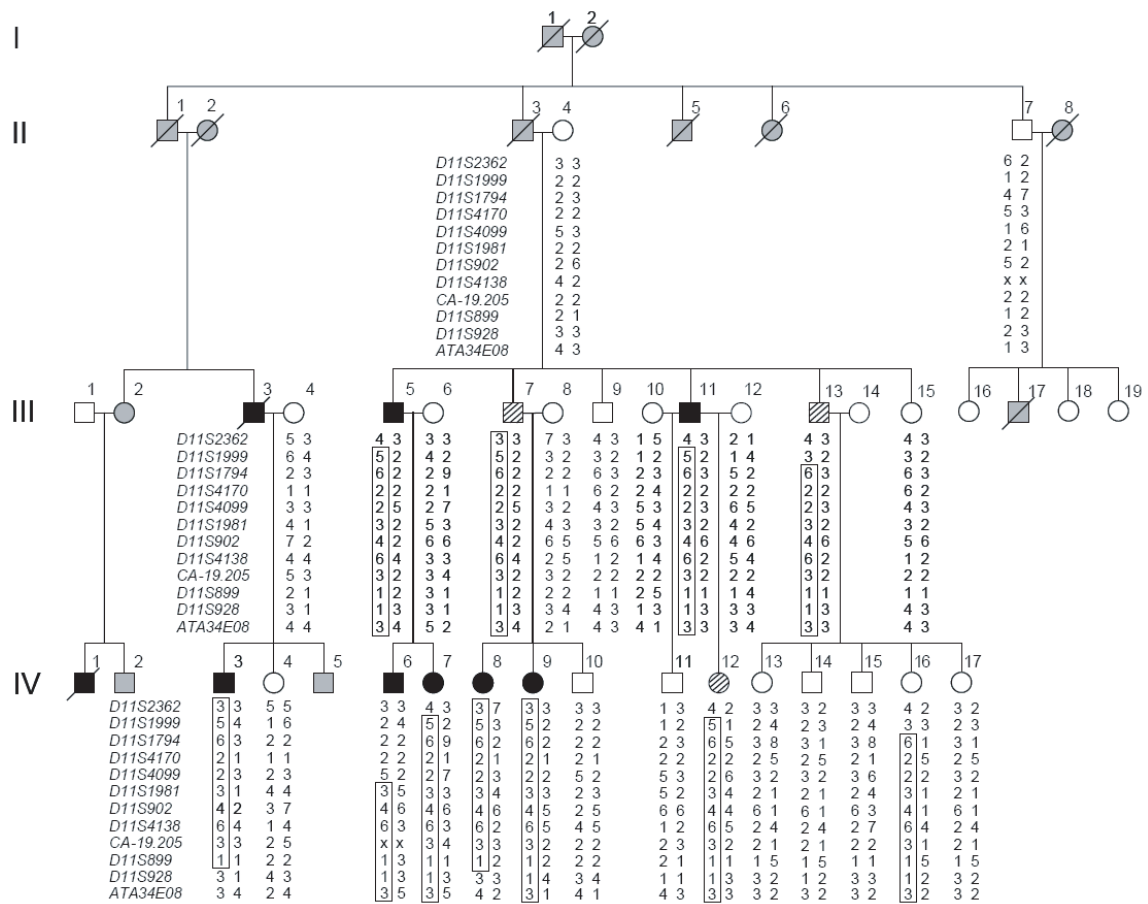


Abbildung 4.4: Stammbaum der Familie LVNC-105 mit Haplotypen. Der betroffene Haplotyp ist umrandet, STR-Marker sind vom Telomer zum Centromer angeordnet.

Die Genotypisierung von 27 Familienmitgliedern mit 8 STR-Markern zeigte die Kosegregation eines bestimmten Haplotyps mit der Erkrankung in dieser Familie (Abb. 4.4). Das Rekombinationsereignis bei Patient IV/6 beim STR-Marker D11S4099 kennzeichnet die distale Grenze des kritischen Intervalls. Proximal begrenzt wird der Bereich durch Rekombinationen bei D11S928 bei den betroffenen Individuen IV/3 und IV/8. Das durch diese STR-Marker gekennzeichnete kritische Intervall hat eine Größe von 4,9 cM. Das entspricht an dieser genomischen Stelle 3,2 Mb.

Die Jugendliche IV/16 hat auch den krankheitsassoziierten Haplotyp. Sie erfüllt nicht die Diagnosekriterien für LVNC, zeigt aber einen nicht normalen Herzphänotyp mit einem kleinen Vorhofseptumdefekt und einer milden Pulmonalklappenstenose. Diese Diagnose zeigt, dass die Ausprägung der LVNC in dieser Familie nicht voll penetrant ist, also nicht alle Träger des betroffenen Haplotyps eine LVNC aufweisen.

STR-Marker	cM*	MB*	LOD-Wert bei θ						
			0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
D11S2362	8,9	4,9	-4,49	-3,00	-0,89	0,02	0,63	0,67	0,43
D11S1999	17,2	10,7	0,20	1,30	2,09	2,28	2,02	1,41	0,68
D11S1794	19,9	13,3	0,42	1,40	1,95	2,05	1,82	1,33	0,71
D11S4170	20,9	14,4	2,83	2,78	2,57	2,30	1,72	1,09	0,44
D11S1981	21,4	17,1	3,39	3,36	3,22	2,99	2,40	1,68	0,88
D11S902	21,4	17,5	5,06	5,00	4,73	4,34	3,41	2,31	1,10
D11S4138	21,4	17,7	3,17	3,14	2,99	2,76	2,20	1,53	0,75
D11S899	23,1	19,4	2,01	1,97	1,81	1,62	1,21	0,79	0,38
D11S928	26,3	20,1	-1,01	0,03	0,78	1,05	1,05	0,74	0,31
ATA34E08	33,0	25,9	-0,65	0,31	0,82	0,93	0,84	0,61	0,33

Tabelle 4.3: Zwei-Punkt-LOD-Werte der STR-Marker auf Chromosom 11p15. Die Zwei-Punkt-LOD-Werte wurden unter den angegebenen Werten der Rekombinationsrate θ [24] zwischen Erkrankung und STR-Marker für einen autosomal-dominanten Erbgang berechnet bei einer Penetranz von 90 %. Die STR-Marker sind vom Telomer zum Centromer angeordnet. *Markerpositionen auf der 'Marshfield sex-averaged linkage map'. Distanzen in Mb sind dem Ensemble Genome Browser entnommen.

Das Kind IV/11 ist als gesund eingestuft, hat aber den proximalen Teil des betroffenen Haplotyps. Der Locus würde sich, je nach Status im Erwachsenenalter, am distalen oder proximalen Enden verkleinern, aber nicht verschieben. Da sich später noch eine LVNC entwickeln könnte, sind die Grenzen bei dieser Person nicht sicher und sind bei den weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt worden.

Eine erneute Zwei-Punkt-LOD-Wert-Berechnung mit 6 der 8 STR-Marker der Feinkartierung ergab für D11S902 einen Wert von 5,06 bei $\theta = 0$ (Tab. 4.3). Damit ist die Wahrscheinlichkeit 100 000 (10^5), dass Erkrankung und STR-Marker gekoppelt weitergegeben werden und es damit kein zufälliges Ereignis ist. Die genomweite Kopplungsanalyse zeigt somit eine eindeutige Kopplung der Erkrankung in der Familie LVNC-105 an den STR-Marker D11S902. Dieses Ergebnis ist auch robust bei der Berechnung mit verschiedenen Penetranzen der Erkrankung in dieser Familie: 90 %-ige Penetranz 5,06 und 75 %-ige Penetranz 4,85.

Desweiteren wurden LOD-Werte mit Hilfe der Mehrpunkt-Analyse berechnet. Dabei ist ein Lokalisationswert als Logarithmus eines Wahrscheinlichkeitsquotienten (Likelihood ratio) ermittelt worden unter Berücksichtigung der chromosomalen Anordnung der STR-Marker. Damit wird die mögliche Position des molekularen Defekts im kritischen Intervall bewertet. Auch bei dieser Berechnung ist die Wertung bei dem STR-Marker D11S902 mit 5,152 am höchsten (Abb. 4.5).

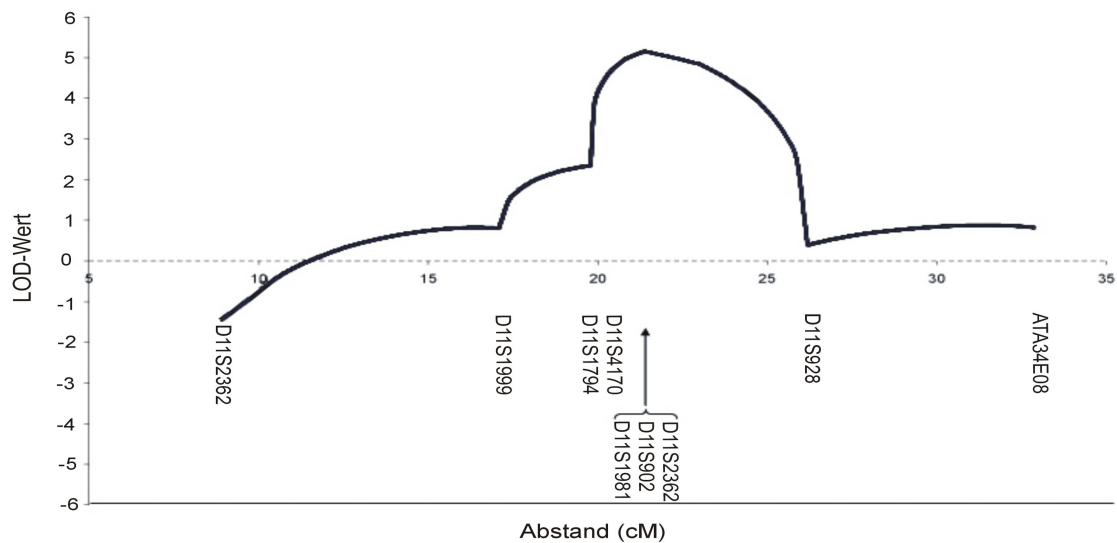


Abbildung 4.5: Ergebnis der Mehrpunkt-Analyse auf Chromosom 11p15 mit einer Penetranz von 90 %.

4.4 Charakterisierung des Erkrankungslokus auf Chromosom 11p15

Das mit der Erkrankung gekoppelte genomische Intervall auf Chromosom 11p15 ist 3,2 Mb groß und für die Ermittlung der darin enthaltenen Gene wurden die beiden Datenbanken 'NCBI' und 'Ensembl' herangezogen. Zum Zeitpunkt der Kopplungsanalyse beinhaltete der Locus 40 Gene. Von 36 Genen waren mRNA- und proteinkodierende Sequenzen bekannt und auch die Funktion beschrieben. 2 dieser Gene waren Pseudogene. Die restlichen 4 der 40 Gene waren vorhergesagte Gene, d.h. es war nur das Transkript experimentell nachgewiesen worden aber nicht das Protein, so dass molekulare Funktion und biologischer Prozess nicht bekannt waren (Anhang A, Seite 75).

Das beste Kandidatengen war *CSRP3*. Das Protein dieses Gens ist eine Komponente der Z-Scheibe im Herz- und Skelettmuskel und fungiert als Mechanosensor [8]. Desweiteren fördert es die Myogenese, da es ein Kofaktor der muskelspezifischen Genexpression ist [5]. Missensemutationen in der T-cap-Domäne wurde bei Patienten mit DCM gefunden und Aminosäureaustausche in der LIM1-Domäne haben HCM zur Folge [60, 33]. Dieser Genlocus wurde nicht auf Kopplung untersucht, weil die Daten erst nach der genomweiten Kopplungsanalyse veröffentlicht worden sind (siehe 4.2).

Ein weiteres Kandidatengen im kritischen Intervall ist *PIK3C2A*. Das Protein dieses Gens gehört zur Familie der Phosphoinositide-3-kinasen (PI3K). Hertig et al. haben gezeigt, dass *NRG-1* und *IGF-I* über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg (PI3K) die Trabekularisierung des Myokards steuern [41]. *PIK3C2A* ist außerdem in den Integrin-abhängigen Signalweg involviert, der auch für die normale embryonale Entwicklung

und kontraktile Funktion des Myokards wichtig ist [41, 47, 89, 119].

Die anderen 38 Gene des Lokus können nach bisherigen Erkenntnissen nicht direkt mit einer Herzmuskelerkrankung in Zusammenhang gebracht werden.

4.4.1 Genomische Untersuchungen zu *CSRP3* und *PIK3C2A*

Um den molekularen Defekt zu finden, der in der Familie LVNC-105 für die Herzmuskelerkrankung verantwortlich ist, wurden zu erst von *CSRP3* und dann von *PIK3C2A* die kodierenden Bereiche untersucht.

Die Sequenzierung der 6 Exons von *CSRP3* und der 32 kodierenden Exons von *PIK3C2A* zeigte keine Mutation in diesen Genen. Eine anschließende Sequenzierung des Promotorbereichs von bis zu 1,5 kb vor dem ersten Exon konnte eine Veränderung in diesen regulatorischen Regionen ausschließen.

CSRP3 und *PIK3C2A* überspannen auf dem Chromosom einen Bereich von 20kb bzw. 80kb und liegen damit unterhalb des Auflösungsbereichs der Array-CGH (siehe 4.2.2). Um Veränderungen in den Intronbereichen untersuchen zu können, ist eine Southern Blot Hybridisierung durchgeführt worden. Die genomische DNA von einem Patienten und einer gesunden Kontrolle wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, SacI, XbaI), im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen und vernetzt. Die korrekte chromosomale Anordnung von *CSRP3* konnte durch die Hybridisierung mit einer Sonde, die aus der gesamten cDNA dieses Gens bestand, und anschließendem Vergleich mit dem Hybridisierungsmuster einer Kontrolle nachgewiesen werden. Für die Untersuchung von *PIK3C2A* sind 5 genomische Sonden verwendet worden. Auch hier waren keine Deletionen oder Insertionen im Vergleich mit einem normalen Bandenmuster zu erkennen.

Um genomische Veränderungen in den intronischen Bereichen der zwei Gene zu erkennen, die zu klein sind, um mit einer Southern Blot Hybridisierung detektiert zu werden, sind Long-Range PCRs durchgeführt worden. Nach dem Verdau der 8 bis 14 kb großen Fragmente mit verschiedenen Restriktionsenzymen und der Auftrennung der Banden im Agarosegel konnte kein Unterschied zwischen einem betroffenen Familienmitglied und einer gesunden Kontrolle festgestellt werden.

Seltene, sehr kleine molekulare Defekte in Intronbereichen, die zu einem falschen Spleißen der mRNA führen, können auch die Ursache einer Herzmuskelerkrankung sein. Ein Beispiel ist eine Punktmutation in einem Branch-Punkt der Spleißsequenzen des Gens *EYA4*, dass zur Deletion eines Introns und anschließenden Exons führt und eine DCM und Gehörlosigkeit zur Folge hat [106]. Um eine mögliche Veränderung in den Introns von *CSRP3* zu detektieren, ist der gesamte genomische Bereich sequenziert worden. Die Untersuchung auf verschiedene Spleißvarianten wurde bei *PIK3C2A*

durch Sequenzierung der cDNA durchgeführt. Im Unterschied zum muskelspezifischen *CSRP3* ist *PIK3C2A* im Blut exprimiert, wodurch die Sequenzierung der cDNA möglich war. Die Analyse der Intronbereiche und der Spleißvarianten ist nur bei diesen zwei wahrscheinlichsten Kandidatengenem durchgeführt worden, weil nur ein Teil der Gene im Locus im Blut exprimiert ist und eine komplette genomische Sequenzierung des Locus im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

4.4.2 DNA-Mutationsanalyse der Gene im Locus

Da die Untersuchungen zu *CSRP3* und *PIK3C2A* keine krankheitsverursachenden Veränderungen gezeigt haben, musste eine Mutation in einem der anderen Gene als Ursache ausgeschlossen werden. Von den 38 vorher nicht untersuchten Genen des Locus wurden bei 30 Genen die kodierenden Exons sequenziert. Die anderen 8 Gene kodieren für 2 ribosomale Proteine, 3 Akut-Phase-Proteine (Verletzung und Entzündung), ein innerohrspezifisches Protein und 2 gewebespezifische Laktatdehydrogenasen. Sie wurden nicht in die Untersuchung mit einbezogen (Anhang A, Seite 75).

Die Sequenzanalyse der kodierenden Exons der 30 Gene zeigte keine krankheitsverursachende Veränderung.

4.5 Expressionsanalyse durch semi-quantitative RT-PCR

LVNC ist eine Erkrankung des Herzmuskels. Demnach könnten Gene, die stark im Herzen exprimiert werden, im Zusammenhang mit dieser Kardiomyopathie stehen. Um die Frage der Expression der Gene des Locus auf 11p15 zu klären, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

4.5.1 Humanes RNA-Expressionsmuster der Gene

Daten zur kardialen Expression aus Literatur (veröffentlichte Northern Blot, RT-PCR) und Datenbanken (NCBI, GeneCards) liegen nur für einen Teil der Gene vor. Für die Analyse der Expression aller Gene wurde die Gesamt-RNA aus humanem adultem und fetalem Herz- und Skelettmuskel verwendet. Nach der Umschreibung mit reverser Transkriptase in cDNA erfolgte die semi-quantitative Analyse mit Hilfe der PCR. Die Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde RNA aus Gewebe, von dem bekannt war, dass das Gen dort exprimiert wird, mitgeführt oder, wenn die Expression nicht bekannt war, sind die Primer so gewählt worden, dass auch genomische DNA als PCR-Template verwendet werden konnte. Zusätzlich wurde das

Vorhandensein des Genprodukts im Transkriptom der Lymphozyten analysiert, da von den betroffenen Familienmitgliedern kein Herzmuskelgewebe für Untersuchungen zur Verfügung stand, sondern nur Blutproben.

Die semi-quantitative Expressionsanalyse zeigt RT-PCR-Produkte im Herzmuskelgewebe bei 22 der 40 Gene (Anhang A, Seite 75). Ein deutlicher Unterschied in der Bandenstärke zwischen fetalem und adultem Herz war nur bei 2 Genen (*USH1C* (angeborene Hörsehbehinderung) und dem Pseudogen *SAA3P*) zu sehen. Im Herzen und nicht im Skelettmuskel exprimiert sind *USH1C* und *PTPN5*. Beide Gene sind auch im Gehirn stark exprimiert - *PTPN5* im Striatum und beeinflusst dort Ionenkanäle in Synapsen. Die Expression im Herzen ist dagegen nur sehr schwach. Von den 22 im Herz exprimierten Genen des Lokus sind bei 16 auch RT-PCR-Produkte in Lymphozyten gefunden worden. *CSRP3* ist das einzige Gen des Lokus, dass nur im Herz- und Skelettmuskel exprimiert wird und dort sehr stark. Der krankheitsassoziierte Lokus enthält kein weiteres Gen mit einer muskelspezifischen Expression.

4.5.2 Analyse der Expression in den Lymphozyten von Patienten

Die Sequenzierung von 32 Genen im Intervall hat in den kodierenden Exons keine Mutation gezeigt. Jedoch können auch Mutationen in den regulatorischen Bereichen zu einer Erkrankung führen. Die Expression im Herzmuskel konnte nicht direkt getestet werden, da von den Patienten keine Gewebeproben vorlagen. Um dennoch die Expression zu untersuchen, wurden die Transkriptmengen in den Lymphozyten der Blutproben verglichen, um eine mögliche generelle Expressionsveränderung zu erkennen. Dafür wurden die cDNA-Mengen von zwei betroffenen und zwei gesunden Familienmitgliedern durch Vergleich der 28SrRNA-RT-PCR-Produktmengen angeglichen. Die Analyse der Bandenstärke der RT-PCR-Produkte von 12 Genen zeigte keinen Unterschied (Abb. 4.6, Tab. A.1). Es sind auch 10 Gene getestet worden, die normalerweise nicht in Lymphozyten exprimiert werden. Bei den erkrankten Individuen waren ebenfalls keine RT-PCR-Produkte zu erkennen.

4.5.3 Expressionsanalyse im embryonalen Rattenherzen

Für die Organogenese ist eine zeitlich korrekte Expression von Entwicklungsgenen entscheidend. Unter der Annahme, dass eine embryonale Entwicklungsstörung vorliegt, sind besonders die Gene von Interesse, die in der Phase des stark trabekularisierten embryonalen Myokards exprimiert werden. Um zu untersuchen, ob bestimmte Gene eine zeitabhängige Expression während der Kardiogenese haben, erfolgte eine Analyse

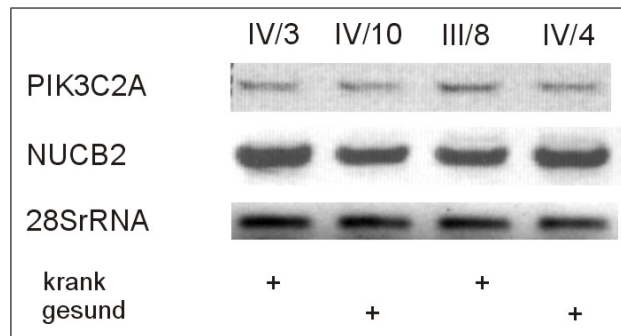


Abbildung 4.6: Expressionsvergleich in den Lymphozyten von gesunden und erkrankten Mitgliedern der Familie LVNC-105. Die Produkte der qRT-PCR wurden im Agarosegel aufgetrennt und die Bandenstärke verglichen.

in embryonalen Rattenherzen. Die Phase, in der der Rattenherzmuskel eine Trabekelstruktur aufweist, ist vom embryonalen Tag E11.5 bis E15.5 [107]. Von 13, 14, 15 und 17 Tage alten Rattenembryonen wurden die Herzen präpariert, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die Analyse von 9 interessanten Genen auf 11p15 wurden die Sequenzen der orthologen Rattengene herangezogen (Anhang A, Seite 75). Nach der semiquantitativen RT-PCR wurden die Bandenstärken im Agarose-Gel verglichen. *BMP10*, das für die Bildung der Trabekel essentiell ist und nur in der Phase vor der Kompaktierung des Herzmuskels exprimiert wird, ist als Vergleich verwendet worden.

Unterschiede zwischen embryonalen und adulten Rattenherzen wurde nur bei 2 Genen (*KCNJ11* und *PIK3C2A*) gefunden, jedoch werden diese auch nach der Kompaktierung weiter exprimiert (Abb. 4.7). Somit haben diese Gene nicht nur im embryonalen Herzen eine Funktion, sondern sind auch für die adulten Kardiomyozyten von Bedeutung.

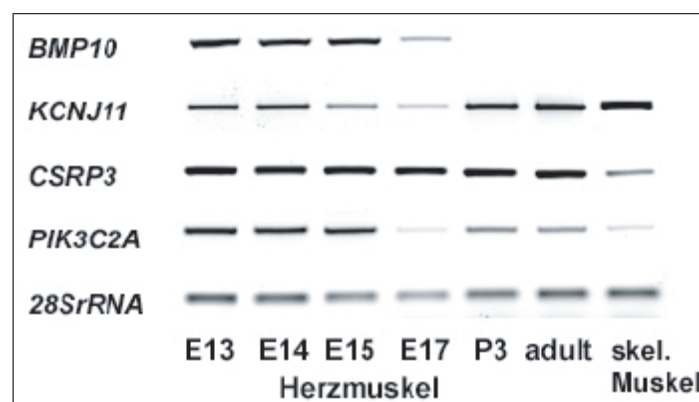


Abbildung 4.7: Expression im Rattenherzen. Produkte der semi-qRT-PCR im Agarosegel aufgetrennt.

4.6 Ergebnisse der bioinformatischen Analysen

4.6.1 Enhancer Element Locator

Das Programm ‘Enhancer Element Locator’(EEL) kann *in silico* mögliche Enhancer-Elemente im Säuger genom identifizieren [39]. Die Analyse zu allen 40 Genen des krankheitsassoziierten Chromosomenabschnitts erfolgte unter Einstellung folgender Parameter: maximale Länge 2000bp und Minimum-Score 300. Nach der Eingabe der jeweiligen Ensembl-Gene-ID-Nummer wurden mögliche Enhancer-Elemente mit einem Score-Wert über 300 und sinnvollen TF-Bindungsstellen innerhalb des Lokus für folgende Gene erhalten:

Gen	Ort [Mb]	Score
<i>MYOD1</i>	17,757	603
<i>MYOD1</i>	17,759	438
<i>MYOD1</i>	17,664	427*
<i>LDH-A</i>	18,300	308
<i>CSRP3</i>	19,219	334
<i>E2F8</i>	19,308	437
<i>NAV2</i>	19,690	558

* bereits publizierter Enhancer [36]

Die Sequenzanalyse dieser potentiellen Enhancerelemente zeigte keinen Unterschied zu den Sequenzen in der Ensembl-Datenbank.

4.6.2 Ultra-konservierte Bereiche

Eine weitere Möglichkeit wichtige genomische Bereiche zu finden ist der Sequenzvergleich mit anderen Spezies. Unter Verwendung der Datenbank UCSC wurden mit Hilfe verschiedener Filterfunktionen hoch konservierte Bereiche in den nicht kodierenden Regionen des Lokus gefunden. Die Auswahl der Filtereinstellungen erfolgte nach Protokollangaben von Bejerano et al. [11].

Die Ergebnisse dieser Analyse decken sich mit bereits sequenzierten potentiellen Enhancerelementen oder mit Exons von vorhergesagten Genen. Ein neuer möglicher regulatorischer oder kodierender Bereich konnte nicht ermittelt werden.

4.6.3 Priorisierung der Gene mit ‘Endeavour’

Mit Hilfe des Programms ‘Endeavour’ ist es möglich, eine Rangfolge (Priorisierung) der Gene im Lokus zu erstellen. Als Grundlage dienen Ähnlichkeiten zu bekannten

Rank	Ous	Pro	Bin	Son	SuE	Mot	Tex	Keg	Swi	Int	Ens	Gen	Cis	Pval
Variante I :														
1	NAV2	LDHA	LDHA	CSR3	CSR3	LDHA	LDHA	LDHA	KCNJ11	USH1C	USH1C	MRGPRX	CSR3	CSR3
2	PIK3C2A	TSG101	TSG101	LDHA	KCNC1	PTPN5	PTPN5	PTPN5	ABCC8	CSR3	LDHA	MRGPRX	KCNC1	LDHA
3	LDHA	USH1C	USH1C	RPS13	NAV2	KCNJ11	KCNJ11	PIK3C2A	CSR3	KCNJ11	TSG101	CSR3	E2F8	TSG101
4	PTPN5	ABCC8	ABCC8	MYOD1		SERGEF	ABCC8	SAAL1	LDHA	ABCC8	MYOD1	SAA3P	HPS5	NAV2
5	SAAL1	RPS13	RPS13	NAV2	LDHA	TMEM86	RPS13	NAV2	TSG101	LDHA	PIK3C2A	TPH1	GTF2H1	KCNJ11
6	MYOD1	HPS5	HPS5	TSG101	USH1C	E2F8	LDHC	GTF2H1	UEVLD	TSG101	SERGEF	KCNJ11	KCNJ11	USH1C
7	PLEKHA7	CSR3	CSR3	HPS5	FAM10A	ABCC8	PIK3C2A	TMEM86	NAV2	UEVLD	E2F8	MRGPRX	MRGPRX	SERGEF
Variante II :														
1	LDHA	NAV2	NAV2	CSR3	CSR3	MRGPRX	CSR3	KCNJ11	CSR3	LDHA	LDHA	LDHA	E2F8	CSR3
2	TSG101	PIK3C2A	PIK3C2A		LDHA	MRGPRX	USH1C	ABCC8	MYOD1	PIK3C2A	PIK3C2A	PTPN5	MRGPRX	LDHA
3	USH1C	LDHA	LDHA	KCNC1	RPS13	MRGPRX	MRGPRX	CSR3	LDHA	RPS13	PTPN5	KCNJ11	MRGPRX	TSG101
4	ABCC8	LDHC	LDHC	FAM10A	MYOD1	TPH1	MRGPRX	LDHA	PIK3C2A	TPH1	NAV2	SAA4	MRGPRX	MYOD1
5	RPS13	MYOD1	MYOD1	HPS5	NAV2	SAA3P	MRGPRX	NUC2	TSG101	KCNJ11	GTF2H1	SERGEF	KCNC1	NAV2
6	HPS5	SAAL1	SAAL1	USH1C	PTPN5	CSR3	TPH1	LDHC	SERGEF	ABCC8	SAAL1	SAA1	MYOD1	KCNJ11
7	CSR3	PLEKHA7	PLEKHA7	NAV2		KCNJ11	SAA3P	FAM10A	HPS5	LDHC	TMEM86	TMEM86	PTPN5	PTPN5

Abbildung 4.8: Ergebnisse der Genpriorisierung mit ‘Endeavour’. Ous: einf. Priorisierung nach Ouzounis Group [118], Pro: einf. Priorisierung mit ‘Prospectr’ [2], Bin: BIN-Datenbank (Protein-Protein-Interaktionen), Son: Expressionsmodell (Son et al.), SuE: Expressionsmodell (Su et al.), Mot: Transkriptionsmotife (TRANSFAC), Tex: publizierte Literatur (MEDLINE, LocusLink), Keg: KEGG Pathway-Datenbank, Swi: Swiss-Prot, Int: InterPro-Datenbank, Ens: Ensembl EST Modell, Gen: GeneOntology, Ci: cis-regulatorische Module (TOUCAN), Pval: p-Wert

Krankheitsgenen, die für LVNC beschrieben sind. Als Basis für die Priorisierung durch ‘Endeavour’ wurden zwei Varianten verwendet. Zuerst wurden alle Gene eingegeben, bei denen Mutationen als Ursache für adulte LVNC bekannt sind: *LDB3*, *LMNA* und *DTNA*. In der Rangliste der Gene waren *CSR3*, *LDHA*, *TSG101*, *NAV2* und *KCNJ11* auf den ersten 5 Plätzen (Abb. 4.8). In der zweiten Analyse wurden alle Gene, die zu einer pathologische Veränderung der Trabekularisierung des Myokards führen, sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen, als Grundlage für die Wertung der Gene im Intervall herangezogen: *BMP10*, *Nkx2.5*, *FKBP12*, *TAZ*, *LDB3*, *LMNA* und *DTNA*. Endeavour bewertet den Transkriptionsfaktor *MYOD1* hierbei sehr viel höher, wodurch er an die dritte Stelle aufrückt (Abb. 4.8).

Bei der ersten Variante handelt es sich um strukturelle Proteine, während bei der zweiten Variante Transkriptionsfaktoren hinzukommen. Dadurch kommt es zu einer etwas veränderten Einordnung der Gene, wobei die ersten Plätze jedoch fast gleich sind. *CSR3*, ein bereits besprochener sehr guter Kandidat, hat in beiden Fällen die höchste

Priorisierung. Die hohe Wertung von Laktat-Dehydrogenase-A (*LDHA*) in mehreren Quellen kommt durch den engen Zusammenhang von Herzmuskelerkrankung und erhöhten *LDHA*-Werten im Blut (Diagnoseparameter) zustande. Bei einer Schädigung der Herzmuskelzellen - als Folge der Erkrankung - wird dieses Enzym freigesetzt. Es ist aber in keinen Fällen Ursache der Herzerkrankung.

4.7 Untersuchung der Kopplung des neuen Lokus auf 11p15 in zwei kleineren Familien mit isolierter LVNC

Für diese Arbeit standen zwei weitere Familie mit vererbter isolierter LVNC zur Verfügung. Die Familie LVNC-104 besteht aus 3 und die Familie LVNC-101 aus 4 Generationen (Abb. 4.9 und Abb. 4.15 (Seite 55)). Die Anzahl informativer Meiosen ist in beiden Familien zu gering für eine aussagekräftige genomweite Kopplungsanalyse. Eine Kopplungsanalyse zu dem neuen LVNC-Lokus auf 11p15 ist aber möglich.

Bei der Genotypisierung der Familienmitglieder mit dem hoch polymorphen STR-Marker D11S902 konnte kein Allel ermittelt werden, dass zusammen mit der Erkrankung in der Familie vererbt wird. Damit ist eine Kopplung an diesen Locus in beiden Familien ausgeschlossen.

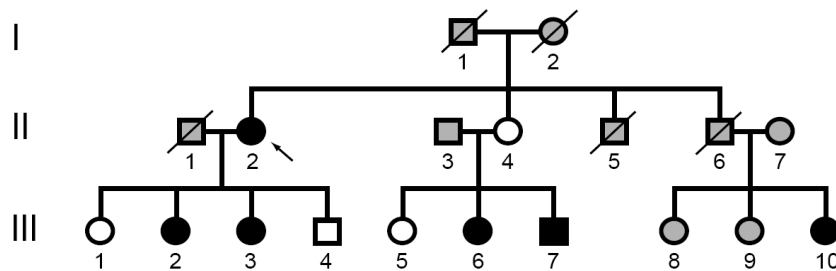


Abbildung 4.9: Stammbaum der Familie LVNC-104.

4.8 Kandidatengen-Screening bei Indexpatienten mit isolierter LVNC

Das untersuchte Patienten-Kollektiv umfasste 63 nicht verwandte kaukasische Indexpatienten mit isolierter 'Linksventrikulärer Noncompaction' (LVNC). Es enthielt 43 Männer und 20 Frauen und das Durchschnittsalter der Patienten bei Diagnosestellung war 40 Jahre (min. 15 J., max. 71 J.).

4.8.1 Sequenzierung der bekannten Kandidatengene für isolierte LVNC *LDB3*, *LMNA*, *Nkx2.5* und *BMP10*

Die 4 LVNC-Kandidatengene, *LDB3*, *LMNA*, *Nkx2.5* und *BMP10*, sind bei 63 Patienten des LVNC-Kollektivs durch Sequenzanalyse auf Mutationen untersucht worden. *α-Dystrobrevin* (*DTNA*) und *Taffazin* (*TAZ*) sind nicht in den Screen einbezogen worden. Patienten mit einer Mutation in *DTNA* haben strukturelle angeborene Herzfehler und die durch *TAZ* verursachte LVNC ist X-chromosomal vererbt und tritt bereits im Kleinkindalter auf. Die hier untersuchten Indexpatienten haben nur die isolierte Form der LVNC und sind älter.

In den untersuchten Kandidatengenen sind 2 neue, bisher unbekannte Nukleotidsubstitutionen gefunden worden, die einen Aminosäureaustausch bewirken: 241A>G in *Nkx2.5* (Gln22Arg) und 1573G>A in *LDB3* (Val635Ile). Diese Substitutionen sind jeweils nur bei einem Indexpatienten gefunden worden. Die betroffenen Aminosäuren sind bis zum Zebrafisch konserviert (Abb. 4.10 und 4.11).

Exon 1				
			R	
<i>H. sapiens</i>	8	TPTPFVKDILNLEQQQRSLAAAGELSARLE	38	
<i>P. troglodytes</i>	8	38	
<i>R. norvegicus</i>	8	.H.....-...D.....	37	
<i>M. musculus</i>	8-...S.D.....	37	
<i>D. rerio</i>	7	.S.....R.....N.EDMV-SLDM.Q..D	36	

Abbildung 4.10: Alignment von Nkx2.5-Proteinen im Bereich der mutierten Aminosäure. Unveränderte Aminosäuren sind als Punkt dargestellt. H.s.: *Nkx2.5* (NP_004378), P.t.: *NKX2-5* (XP_518104.2), R.r.: *Nkx2-5* (NP_446103), M.m.: *Nkx2-5* (NP_032726), D.r.: *nkx2.5* (NP_571496)

Um zu klären, ob es sich um allgemeine SNPs (single nucleotide polymorphism) handelt, wurde das entsprechende Exon in *LDB3* und *Nkx2.5* bei 230 gesunden Kontrollindividuen sequenziert. In keinem der 460 untersuchten Chromosomenabschnitte sind diese Veränderungen gefunden worden.

Nach diesen Ergebnissen sind die Eltern des Patienten mit der Sequenzvariation in *Nkx2.5* klinisch untersucht und eine Blutprobe entnommen worden. Die genetische Analyse zeigte eine Vererbung des veränderten Allels von der gesunden Mutter während das normale Allel vom Vater stammt, der eine auffällige linksventrikuläre Myokardstruktur hat, ohne dass die Kriterien der LVNC erfüllt waren. Die Genotypisierungen der Eltern und des Patienten mit den hochpolymorphen STR-Markern D1S2703 und DYS389 bewiesen die Elterschaft und dass bei den Untersuchungen die DNA des Vater und der

Exon 11					
<i>H. sapiens</i>	620	EVMHALRQTHHTCFV	I	CAACKKPFGNSLFHM	650
<i>P. troglodytes</i>	484	516
<i>M. musculus</i>	554	584
<i>D. rerio</i>	536G.....	566

Abbildung 4.11: Alignment von LIM-Domänen-Bindungsproteinen (LDB) im Bereich der mutierten Aminosäure. *H.s.*: LDB3-Isoform 1 (NP_009009), *P.t.*: LIMD1 (XP_001147828), *M.m.*: LDB3-Isoform b (NP_001034160), *D.r.*: ldb3 (AAY27884.1), bei *R.n.* ist kein orthologes Gen bekannt.

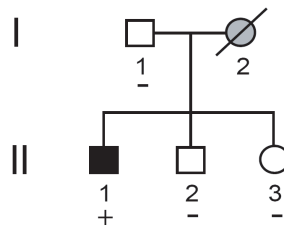


Abbildung 4.12: Stammbaum der Familie LVNC-119.

Mutter nicht vertauscht worden waren. Damit ist diese Veränderung als krankheitsverursachende Mutation ausgeschlossen. Die Sequenzierung der 230 gesunden Kontrollen zeigte, dass es sich um einen sehr seltenen SNP handelt.

Eine Untersuchung von weiteren Verwandten des Patienten mit der *LDB3*-Variation zeigte, dass keines der untersuchten und gesunden Familienmitglieder den Nukleotidaustausch 1573G>A hat, nur der erkrankte Indexpatient II/1 (Abb. 4.12). Dieser Nukleotidaustausch hat die Aminosäuresubstitution V635I in einer der 3 LIM-Domänen des Proteins zur Folge. Eine LIM-Domäne besteht aus einer speziellen Zink-Finger-Struktur, die ein Interface für Protein-Protein-Interaktionen ist.

4.8.2 Mutationsanalyse von Genen sarkomerer Proteine bei LVNC-Indexpatienten

In dieser Arbeit wurden erstmals Gene sarkomerer Proteine auf Mutationen bei LVNC-Patienten untersucht (siehe 1.2.3): *kardiales β -Myosin Heavy Chain (MYH7)*, *kardiales α -Aktin (ACTC)*, *kardiales Troponin T (TNNT2)*, *kardiales Troponin I (TNNI3)*, *regulatorische Myosinleichtkette (MYL2)*, *essentielle Myosinleichtkette (MYL3)* und *α -Tropomyosin (TPM1)*.

Die Mutationsanalyse der Exonbereiche und der Exon/Intron-Grenzen wurde mit der DHPLC-Methode durchgeführt (siehe 3.6). Nach dem Vergleich der Chromatogramme sind die PCR-Produkte von Indexpatienten mit abweichender Chromatogramm-

Transkript	Exon	Protein	Domäne	Familie od. (ID)
<u>MYH7</u>				
801_803delGAC	8	Asp239del	ATP-Bindung	/ (AJ)
814G>A	8	Arg243His*	ATP-Bindung	LVNC-107
818+1G>A	8	Spleißstelle	ATP-Bindung	LVNC-101,-108
818+3G>C	8	Spleißstelle	ATP-Bindung	LVNC-109
840T>C	9	Phe252Leu	ATP-Bindung	/ (SD)
4161C>T	30	Arg1359Cys	Myosin-Schwanz	/ (IP)
<u>ACTC</u>				
478G>A	3	Glu101Lys*	Myosin-Bind.	LVNC-110,-111
<u>TNNT2</u>				
450C>T	10	Arg131Trp*	Troponin-Schwanz	/ (CR)
<u>TPM1</u>				
765G>A	6	Glu192Lys	TNNT2-Bind.	/ (KR)
933A>G	8	Lys248Glu	TNNT2-Bind.	LVNC-117

Tabelle 4.4: Liste der gefundenen Mutationen in Genen sarkomerer Proteine. *bekannte Mutationen [4, 72].

Morphologie sequenziert worden (Abb. 4.13). Dabei sind neben bekannten Polymorphismen bei 12 der 63 Patienten (19 %) krankheitsassoziierte Veränderungen in sarkomeren Proteinen gefunden worden (Tab. 4.4). In den Genen *TNNI3*, *MYL2* und *MYL3* waren keine Mutationen vorhanden.

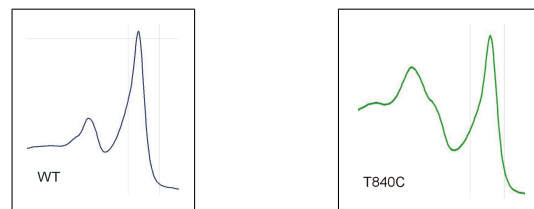


Abbildung 4.13: Beispiel-Chromatogramme der DHPLC-Analyse von MYH7-Exon9. Links: Wildtyp; Rechts: PCR-Produkt des heterozygoten LVNC-Patienten.

Mutationen in *MYH7*

Überwiegend sind Mutationen in *MYH7* verantwortlich für HCM-Erkrankungen [96]. Auch in dem hier untersuchten LVNC-Kollektiv ist dieses Gen bei einem großen Teil der Patienten (12 %) krankheitsassoziiert. Es wurden 6 verschiedene Mutationen bei 7 Patienten gefunden, die zu Aminosäureaustauschen, Deletion und Spleißstellenveränderungen führen (Tab. 4.4). Zu jeder Mutation ist die DNA von 180 gesunden Kontrollen untersucht worden und in keinem der 360 Chromosomen waren diese Veränderungen vorhanden. Das Alignment von Myosinproteinen verschiedener Spezies zeigte eine starke Konservierung der mutierten Aminosäuren (Abb. 4.14). Asp239 ist bis *D. melanogas-*

		Exon 8/9	Exon 30
		del H L C	
<i>H.sapiens</i>	236	VRNDNSSRFGKFIRIHFGAT	1354 AELQRVLSK
<i>R.norveg.</i>	236	1355
<i>G.gallus</i>	238	1359 G...A...
<i>D.rerio</i>	235	I.....S	1357GM..
<i>D.melanog.</i>	235P.	1354 .D...Q...
<i>C.elegans</i>	239	...N.....SKQ	1554 E...G.D.

Abbildung 4.14: Alignment von Myosinproteinen im Bereich der mutierten Aminosäuren. Unveränderte Aminosäuren sind als Punkt dargestellt. *H.s.*: MYH7 (NP_000248), *R.n.*: MYH7 (NP_058936), *G.g.*: MYH1 (NP_001013414), *D.r.*: vmhc (AAF00096), *D.m.*: Mhc (NP_723999), *C.e.*: myc-2 (NP_510092)

ter konserviert und Arg243, Phe252 und Arg1359 sind auch bei *C.elegans* unverändert. Die Spleißstellen sind auch sehr konserviert: die 2 Nukleotide nach dem Exon (GT) zu 100 % und an der 3. Stelle sind fast immer Adenin oder Guanin zu finden [86].

Bei 4 der 7 Mutationen im *MYH7*-Gen standen zusätzlich zum Indexpatienten DNA und klinische Daten von weiteren Familienmitgliedern zur Verfügung. Damit konnte die Kosegregation der Mutationen 814G>A, 818+1G>A und 818+3G>C mit der Erkrankung in den Familien gezeigt werden (Abb. 4.15). Die Spleißstellenmutation 818+1G>A war in 2 Familien (LVNC-101 und LVNC-108) zu finden. Durch eine Haplotypanalyse der erkrankten Familienmitglieder mit dem STR-Marker D14S990 wurde ein gemeinsamer genetischer Ursprung der Mutation ausgeschlossen, weil das jeweils betroffene Allel in beiden Familien unterschiedlich war. Die Kopplungsanalyse in der Familie LVNC-101 ergab einen LOD-Wert von 2,55 ($\theta=0$) mit dem STR-Marker D14S990.

5 der 6 Mutationen klustern bei Exon 8 und 9 (Abb. 4.16). Im Protein befinden sie sich in der ATP-Bindungstasche des Myosin-Kopfes, während der Aminosäureaustausch der Mutation in Exon 30 im Schwanz des Myosinproteins ist (Abb. 4.17). Aus den Eigenschaften der 3 mutierten Aminosäuren in der ATP-Bindungstasche und der Lage der Seitenketten in der Proteinkristallstruktur kann man annehmen, dass die gefundenen Veränderungen sehr starke Auswirkungen auf die Bindung von ATP und die Hydrolyse der Phosphatbindung haben (Abb. 4.18): Das Asp239 stabilisiert durch Salzbrückenbindung mit Lys679 das äußere Ende der ATP-Bindungstasche. Ein Fehlen von Asp293 könnte die sterische Struktur der Bindungsspalte ändern und die ATP-Bindung behindern. Das positiv geladene Arg243 ist direkt an der Bindung des γ -Phosphates beteiligt [38] und ein Austausch mit Histidin kann eine Verringerung der ATP-Hydrolyse zur Folge haben. Der große hydrophobe Ring der Seitenkette von Phe252 ist Teil eines hydrophoben Clusters. Ein Austausch mit der kleineren Seitenkette des Leucins könnte

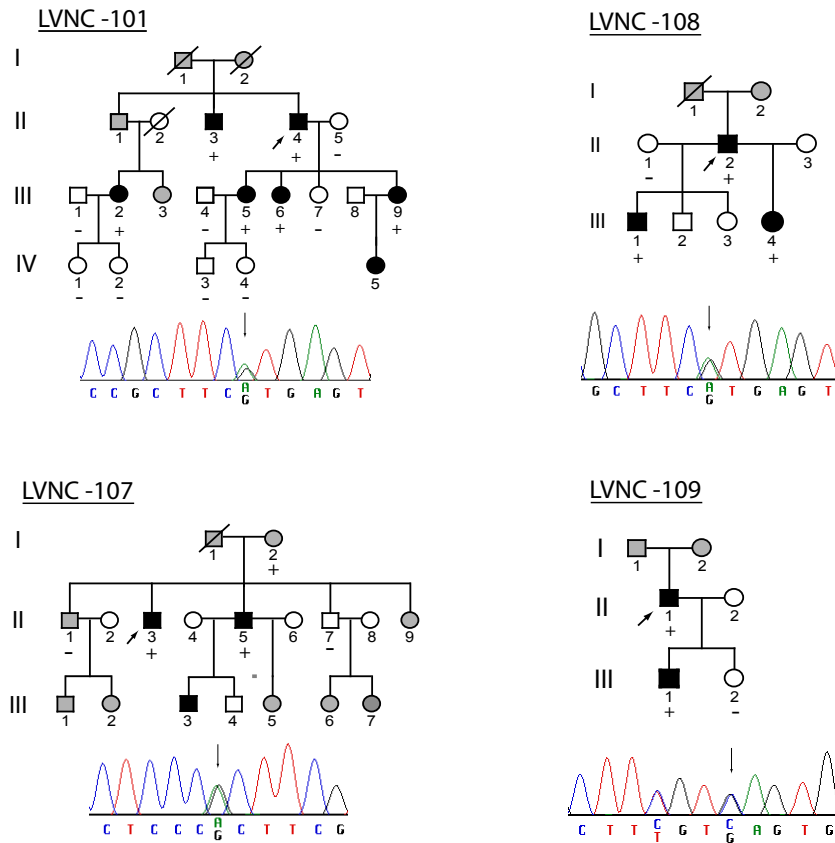


Abbildung 4.15: Stammbäume und Sequenzen der Familien mit einer Mutation in MYH7. LVNC-101, -108: 818+1G>A; LVNC-109: 818+3G>C; LVNC-107: Arg243His.

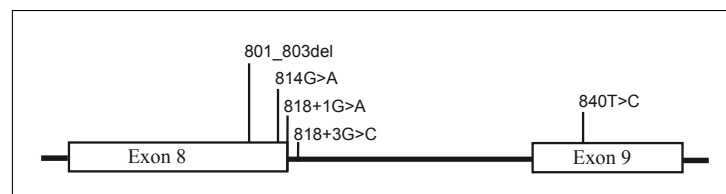


Abbildung 4.16: Häufung der LVNC-Mutation in MYH7 bei Exon 8/9.

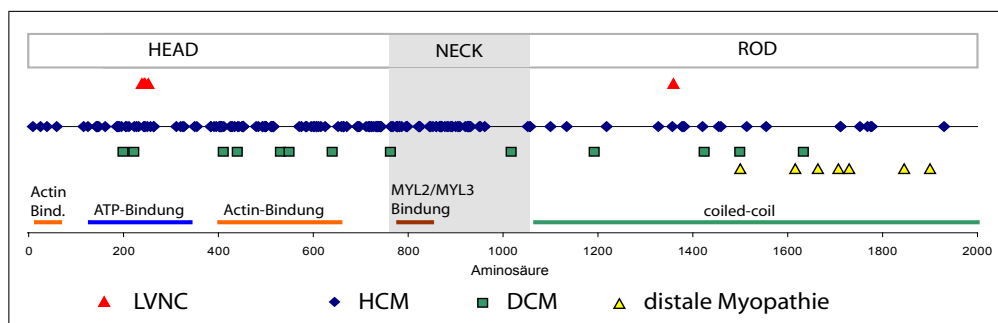


Abbildung 4.17: Verteilung der bekannten Kardiomyopathie-Mutationen im MYH7-Protein. Position und Anzahl der Mutationen für HCM (197), DCM(13) und distale Myopathie (7) sind der Datenbank 'CardioGenomics' entnommen (letzte Aktualisierung April 2006), die 6 LVNC-Mutationen sind in dieser Arbeit beschrieben.

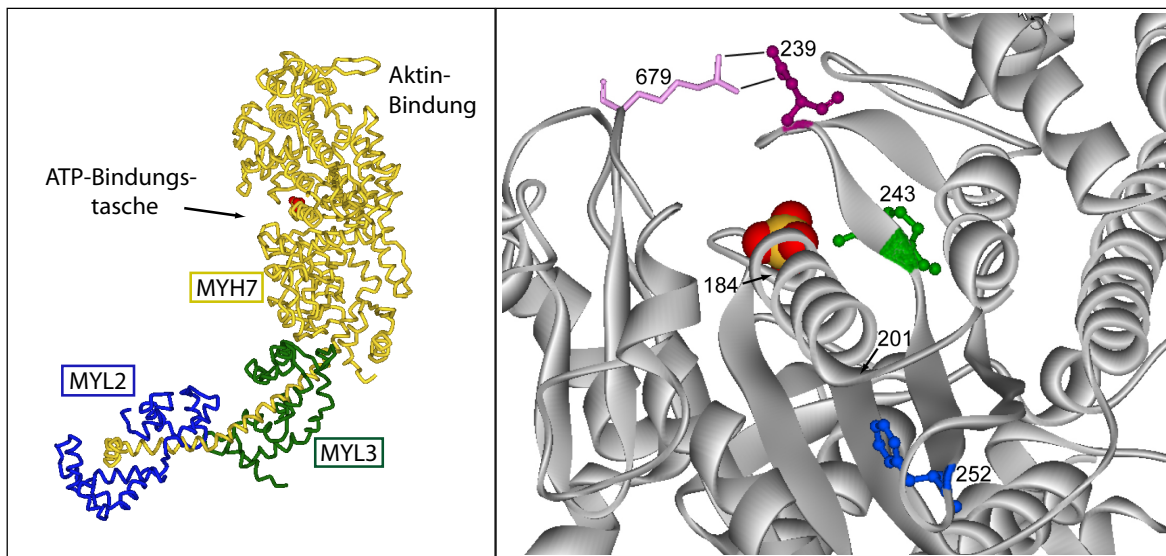


Abbildung 4.18: Positionen der betroffenen Aminosäuren in der ATP-Bindungstasche des MYH7-Proteins. 3D-Modell aus der Kristallstruktur des Skelettmuskelsmyosin-S1-Fragments von *G.gallus*; Links: Überblick über das gesamte S1-Fragment mit Myosinkopf und Hals; Rechts: Vergrößerung der ATP-Bindungstasche ([95], erstellt mit Accelrys DS Visualizer)

ein Verschieben des Clusters und der daran anschließenden α -Helix (Lys184-Ala201) zur Folge haben. Diese α -Helix bildet den Boden der ATP-Bindungstasche.

Die strukturelle Auswirkung der Aminosäuresubstitution Arg1359Cys in Exon 30 ist schwer vorauszusagen. Im Myosinschwanz fehlt die positive Ladung von Arg1359 und das dafür vorhandene Cystein könnte mit einem Cystein eines anderen Myosinschwanzes im Myofilament eine Disulfidbrückenbindung eingehen.

Für die Untersuchung der Auswirkung der Mutationen in der Donorspleißstelle des Intron 8, 818+1G>A und 818+3G>C, stand die RNA aus Lymphozyten von jeweils einem Patienten zur Verfügung. *MYH7* ist ein fast ausschließlich kardial exprimiertes Gen und im Blut ist nur sehr wenig Transkript zu finden. Eine Detektion von verschiedenen Spleißprodukten war nur mit einer Nested-PCR erfolgreich. Die Auftrennung im Agarose-Gel zeigte neben der 583 bp Wildtyp-Bande weitere Banden, die jedoch nicht konsistent waren (Abb. 4.19). Das könnte an der geringen Transkriptmenge in den Lymphozyten und der dadurch nicht stabilen Nested-PCR liegen. Bei 10 gesunden Kontrollen war außer der Wildtyp-Bande keine weitere Bande zu sehen. Die Klonierung der zusätzlichen Spleißvarianten war nur bei dem PCR-Produkt der Patientin III/4 (LVNC-108) erfolgreich. Die Sequenzierung des klonierten PCR-Produkts ergab, dass das Intron 8 (102 bp) durch das Fehlen der Donorspleißstelle nicht herausgespleißt wurde. In Abbildung 4.20 ist die veränderte Transkriptsequenz des mutierten *MYH7* an dem statt des Guanin eingebauten Adenins erkennen. Bei dieser Spleißvariante folgt

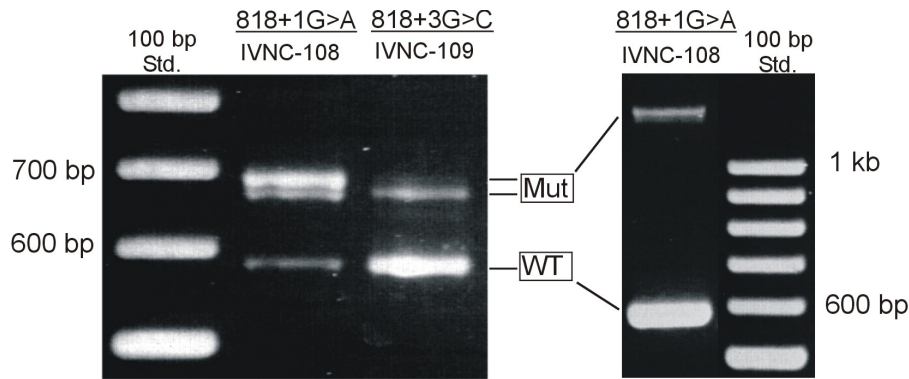


Abbildung 4.19: Transkripte von MYH7 (Exon 8 bis 13). Mut: mutierte Spleißprodukte, WT: Wildtyp (583 bp).

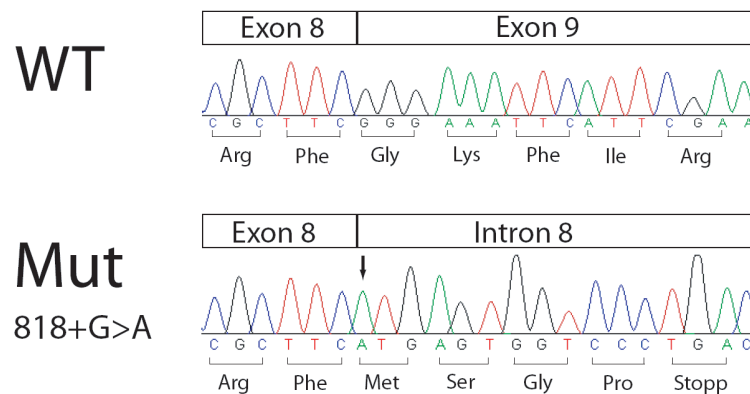


Abbildung 4.20: Transkriptsequenzen von MYH7. Wildtyp und Donorsequenz-Mutation (Pfeil) bei Patientin III/4 der Familie LVNC-108.

nach 4 Aminosäuren ein vorzeitiges Stopp-Codon (Met245fsStop249). Für gesicherte Aussagen zu Spleißvarianten und daraus folgenden Proteinen und Proteinmengen ist Herzmuskelgewebe von Patienten nötig. Das stand jedoch nicht zur Verfügung.

Mutationen in *ACTC*

Die DHPLC-Analyse des *kardialen α-Aktin*-Gens (*ACTC*) ergab eine Nukleotidsubstitution in Exon 3 (478G>A) bei 2 der untersuchten Indexpatienten (Tab. 4.4, S. 53). Zu beiden Patienten waren DNA und klinische Daten der Eltern vorhanden (LVNC-110, LVNC-111). Die Sequenzierung und die Befunde zeigten, dass die von LVNC betroffenen Väter die Erkrankung an ihre Kinder vererbt hatten. Eine Haplotyp-Analyse mit einem intragenischen STR-Marker schloss einen gemeinsamen genetischen Ursprung der Mutation in beiden Familien aus.

Exon 9/10				
			W	
<i>H. sapiens</i>	121	VSLKDRIERRRA	AERAEQQRIR	141
<i>R. norvegicus</i>	133	I.....K.....		153
<i>M. musculus</i>	124	I.....K.....		144
<i>G. gallus</i>	135	I.....Q.....		155
<i>D. rerio</i>	123	I.....K..S.....		143
<i>C. elegans</i>	110	RE..EKQ.K.....	E.DE.QF	130

Abbildung 4.21: Alignment von kardialen Troponin T2-Proteinen im Bereich der mutierten Aminosäure. *H.s.*: TNNT2-Isoform 3 (NP_001001431), *R.n.*: Tnnt2 (NP_036808), *M.m.*: Tnnt2 (NP_035749), *G.g.*: TNNT2 (NP_990780), *D.r.*: tnt2 (NP_690853), *C.e.*: tnt-2 (NP_001024703)

Mutation in *TNNT2*

Die Untersuchung der kodierenden Bereiche des *kardialen Troponin T* (*TNNT2*) zeigte eine Missensemutation (Arg131Trp) in Exon 10 bei einer LVNC-Patientin (Tab. 4.4, S. 53). Es handelt sich bei ihr um eine de novo-Mutation, weil die gesunden Eltern kein mutiertes Allel aufweisen und die Genotypisierung mit dem hoch polymorphen STR-Marker D1S2703 die Verwandtschaft zu den Eltern bestätigte. Das betroffene Arg131 in der Troponin-Schwanz-Domäne ist evolutionär sehr konserviert (Abb. 4.21). Der zugrunde liegende 450C>T-Austausch wurde in keinem der 360 untersuchten Kontrollchromosomen gefunden.

Mutationen in *TPM1*

2 LVNC-Indexpatienten zeigten Veränderungen im kodierenden Bereich von α -*Tropomyosin* (*TPM1*) (Tab. 4.4, S. 53). Die Mutation 765G>A in Exon 6 ist nur bei einem schwer betroffenen Einzelpatienten gefunden worden, während 933A>G in Exon 8 bei weiteren Familienmitgliedern des Indexpatienten untersucht werden konnte: 2 betroffene Kinder und eine erkrankte Enkelin haben die selbe Mutation (LVNC-117, Abb. 4.22). Die aus den Mutationen entstehenden Aminosäureaustausche Glu192Lys und Lys248Glu befinden sich in der *TNNT2*-Bindungsdomäne [122]. Die Konservierung bis zum Fadenwurm (*C.e.*) weist auf eine wichtige funktionelle Bedeutung hin (Abb. 4.23).

Sequenzvariation in *MYL2*

Die Analyse der Exonbereiche der regulatorischen Myosinleichtkette (*MYL2*) zeigte eine Sequenzvariation (87G>A) in Exon 2 bei einem LVNC-Indexpatienten (LVNC-102, II/1). Die daraus resultierende Ala13Thr-Substitution konnte auch bei der betroffenen

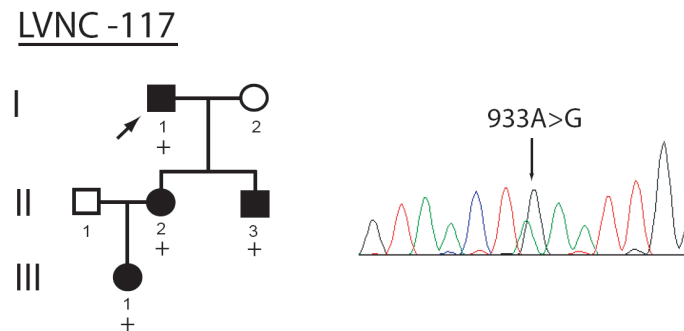


Abbildung 4.22: Stammbaum der Familie LVNC-117 mit Lys248Glu in Exon 8 des TPM1-Gens.

	Exon 6	Exon 8
<i>H.sapiens</i>	182 RAELSEGKCAELEEELKTVTN	238 RAEFAERSVTKLEKSIDDLED
<i>R.norveg.</i>	182S.....	238S.....
<i>G.gallus</i>	182S.....	238S.....
<i>D.rerio</i>	182N...S.....S	238A...T.....
<i>D.melanog.</i>	182 KV....S.IV.....RV.G.	238Q...Q.EV.R...
<i>C.elegans</i>	182 ...AG.N.IV.....RV.G.	238Q...Q.EV.R...

Abbildung 4.23: Alignment von Tropomyosinproteinen im Bereich der mutierten Aminosäuren. Unveränderte Aminosäuren sind als Punkt dargestellt. *H.s.*: TPM1 (NP_001018005), *R.n.*: Tpm1 (NP_001029240), *G.g.*: TPM1 (P04268), *D.r.*: tpma (NP_571180), *D.m.*: Tm1 (NP_996216), *C.e.*: lev-11 (NP_001021695)

Schwester (II/4) identifiziert werden, jedoch nicht bei dem Neffen (III/2), der auch eine eindeutige LVNC hat (Abb. 4.24). Die Genotypisierung der erkrankten Familienmitglieder mit dem STR-Marker D12S1645 zeigte eine Kosegregation eines Allels mit der Variation bei den Individuen II/1 und II/4, aber nicht bei III/2. Damit ist die Substitution Ala13Thr in dieser Familie nicht krankheitsverursachend. Die Sequenzvariation war nicht in 360 gesunden Kontrollchromosomen vorhanden. Anscheinend handelt es sich um einen sehr seltenen Polymorphismus.

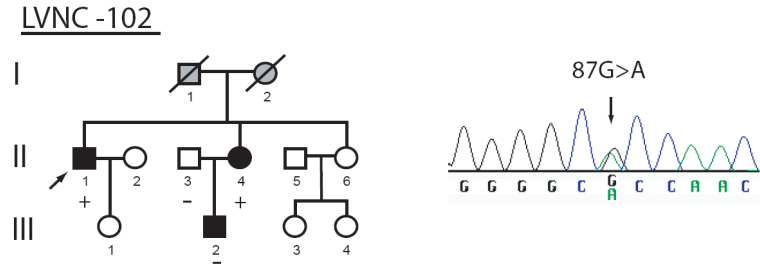


Abbildung 4.24: Stammbaum der Familie LVNC-102 mit einer Sequenzvariation im MYL2-Gen. (Ala13Thr in Exon 2).

Familie	ID	Alter(J.) /Geschl.	NY HA	Echokardiographie				EKG	kardiovaskuläre Komplikationen
				Ort d. LVNC*	RV†	LVED (mm)	EF/FS (%)		
<u>MYH7</u>									
LVNC-101	II/3	70/M	3	2	ja	MD	20/NV	AF, AVB1	HI, PTE, PHT, KAS
	II/4	60/M	1	2	ja	66	27/14	T↓	NSVT, CVS, SPTE
	III/2	46/F	1	1	nein	48	55/29		/
	III/5	40/F	1	2	nein	47	65/31		NSVT
	III/6	39/F	1	1	nein	50	60/NV		/
	III/11	24/F	1	2	nein	47	45/21		/
LVNC-107	I/2	68/F	1	2	nein	48	43/40		/
	II/3	25/M	3	2	nein	68	20/9	AF, LBBB, ST↓	HI, SPTE, PTE, HTx mit 26 J.
	II/5	32/M	2	2	ja	54	50/30		/
LVNC-108	III/3	2/M	1	2	ja	30	76/34		/
	II/2	36/M	1	2	ja	53	54/28	AVB1	/
	III/1	8/M	1	2	ja	43	48/25	AVB1	/
	III/4	16/F	1	1	nein	NB	67/NA		/
LVNC-109	II/1	50/M	2	2	nein	60	45/32		HI
	III/1	14/M	1	2	nein	47	65/31		/
sporadisch	AJ	65/M	2	2	ja	51	NA/16	RBBB, AVB1	HI
sporadisch	SD	58/M	2	2	ja	73	34/12		HI, NSVT, Tod m. 68 J.
sporadisch	IP	29/M	3	1	ja	78	14/9	LBBB,ST↓	HI, CVS, AF bei EPU, ICD
<u>ACTC</u>									
LVNC-110	LJ	15/F	1	2	nein	41	60/32		HHS, Syncopen, HS
	LN	58/M	3	2	nein	65	30/22		HI, PHT, Syncopen
LVNC-111	SA	38/F	3	2	nein	48	68/33	AF, ST↓	HI, PHT
	VK	73/M	2	2	nein	45	40/17		/
<u>TNNT2</u>									
sporadisch	CR	20/F	4	2	nein	64	20/14		HI, TIA
<u>TPM1</u>									
LVNC-117	I/1	63/M	3	2	nein	62	19/18		HI
	II/2	32/F	1	1	nein	49	37/20		/
	II/3	34/M	1	1	nein	50	53/32		/
	III/1	0/F	3	0	nein	35	22/16		AF,HI, HTx mit 5J.
sporadisch	KR	55/M	2	2	ja	54	42/NV		/

Tabelle 4.5: Klinische Daten der Erstdiagnose betroffener Familienmitglieder mit Mutationen in sarkomeren Proteinen. *nicht-kompaktierte Segmente, Abschnitte: Apex=1; Apex, midventr. Wand=2; Apex, midventr. und basale Wand=3; RV† -

rechtsventrikulär Beteiligung; LVED - linksventrikulärer enddiastolischer Diameter; EF/FS - linksventrikuläre Ejektionsfraktion/ fraktionelle Verkürzung des Herzmuskels; MD - massive Dilatation; NB - Normalbereich; NV - nicht vorhanden; AVB1 - atrioventrikulärer Block 1. Grades; LVBB - Linksschenkelblock; RBBB - Rechtsschenkelblock; ST↓ - ST-Inversion; T↓ - T-Welleninversion; AF - Vorhofflimmern/-flattern; HI - Herzinsuffizienz; PHT - pulmonale Hypertonie; ICD - intrakardialer Defibrillator; NSVT - nicht anhaltende Kammertachykardie; HTx - Herztransplantation; EPU - elektrophysiologische Untersuchung; CVS - zerebrovaskulärer Schlaganfall; SPTE - systemisch periphere Thrombembolie; PTE - Lungenthrombembolie; KAS - Koronararterienstenose; HS - Herzschrittmacher; HHS - hypoxischer Hirnschaden; TIA - transitorische ischämische Attacke; NYHA - New York Heart Association-Klassifikation.

Kapitel 5

Diskussion

Die Herzmuskelerkrankung LVNC tritt gehäuft familiär auf [98, 23, 102]. Diese Tatsache weist auf eine genetische Ursache hin, aber bisher ist nur bei wenigen Patienten der molekulare Defekte bekannt und der zugrunde liegende pathologische Mechanismus ist noch ungeklärt [56, 22].

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der genetischen Ursache für die 'Linksventrikuläre Noncompaction' in der Familie LVNC-105 und die Untersuchung der Häufigkeit von Mutationen in Kandidatengenen in einem großen Kollektiv von LVNC-Indexpatienten.

Ein Ergebnis der Arbeit ist die Kopplung der Erkrankung in der Familie LVNC-105 an einen 3,2 Mb großen Locus auf dem Chromosom 11p15. Daneben offenbarte die Mutationsanalyse in einem LVNC-Indexpatienten-Kollektiv neue Krankheitsgene für die LVNC. Bei ungefähr 19 % der 63 Indexpatienten sind Mutationen in Genen, die für sarkomerer Proteine kodieren, mit der Krankheit assoziiert.

5.1 Klinische Evaluierung der Familie LVNC-105

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Familie LVNC-105 bestand aus 4 Generationen und 46 Personen (Abb. 4.1). Bei der klinischen Untersuchung der genetisch verwandten Familienmitglieder ist bei 9 Individuen eine LVNC diagnostiziert worden. Eine isolierte Form der LVNC liegt in der Familie nicht vor, da bei 7 Betroffenen ein angeborener Herzfehler, bei 2 anderen eine schwache Pulmonalklappenstenose und bei 5 Patienten einen milden Mitralklappenprolaps. 3 Personen haben nur einen partiell penetranten LVNC-Phänotyp, da das Verhältnis von nicht kompakter zu kompakter Herzmuskelschicht kleiner als 2 ist und somit nicht den Diagnosekriterien entspricht (siehe 1.2.1). Individuum IV/7 hat erst nach ihrem 13. Lebensjahr eine LVNC entwickelt. Die LVNC zeigt damit eine altersabhängige Penetranz.

Das klinische Bild in der Familie LVNC-105 ist nicht homogen, da neben dem hypertrabekularisierten Myokard weitere verschiedene Herzveränderungen vorkommen. Vom Auftreten unterschiedlicher Phänotypen in einer Familie, besonders mit Merkmalen der DCM, ist bereits verschiedene Male berichtet worden [76, 40, 12].

5.2 Genetische Charakterisierung der Familie LVNC-105

Die Untersuchung des Karyotyps eines Patienten zeigte eine normale Anzahl an Chromosomen und Chromosomenbanden. Damit wurden größere Abberationen ausgeschlossen werden. Eine Deletion oder eine Duplikation eines genomischen Abschnitts (im Auflösungsereich der Methode) sind durch eine Array-CGH ausgeschlossen worden. Eine Inversion kann mit dieser Methode jedoch nicht ausgeschlossen werden. Außerdem ist die zu erwartende chromosomale Veränderung in der Familie LVNC-105 relativ klein. Größere Abberationen verursachen in der Regel syndromale Erkrankungen, da auf dem betroffenen Abschnitt dann meist mehrere Gene liegen und verschiedene Krankheitssymptome (Dysmorphien, geistige Behinderung usw.) zu Folge haben. Seltene, nur ein Gen betreffende chromosomale Veränderungen liegen in der Familie LVNC-105 anscheinend nicht vor.

Die Kopplungsanalyse der Herzmuskelerkrankung in der Familie LVNC-105 mit bereits bekannten Kardiomyopathie-Loci (LVNC, HCM, DCM) zeigten keinen Haplotyp, der in der Familie mit der Erkrankung kosegregiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass die LVNC in der Familie LVNC-105 auf einer bisher unbekannten genetischen Ursache beruht.

5.3 Neuer Erkrankungsloкус für LVNC auf Chromosom 11p15

Die Zwei-Punkt-Kopplungsanalyse zeigte nur an einer Stelle (D11S1981) einen LOD-Wert größer als 3. Daraufhin wurde an diesem genomischen Ort eine Feinkartierung mit weiteren STR-Markern und zusätzlichen 6 Familienmitgliedern durchgeführt. Der höchste LOD-Wert von 5,06 lag bei D11S902 (Tab. 4.3, S. 42). Die anschließende Haplo-typanalyse identifizierte einen betroffenen Haplotyp, der in der Familie LVNC-105 mit der Erkrankung kosegregiert (Abb. 4.4, S. 41).

Ein Individuum mit betroffenem Haplotyp (IV/16) zeigte in der 2D-Echokardiographie keine LVNC, jedoch einen angeborenen Herzfehler (ASD). Die unterschiedliche

Ausprägung der Herzerkrankung in dieser Familie ist kongruent zu bereits publizierten LVNC-Familien mit unterschiedlichen intrafamiliären Phänotypen [40, 76].

Der 2004 publizierte LVNC-assoziierte Locus auf 11p15 von 6,4 cM (6,8 Mb) mit 70 Genen (Ensembl, NCBI) [103] konnte durch weitere Arbeiten der oben genannten Feinkartierung auf 4.9 cM (3,2 Mb) weiter eingengt werden. Rekombinationsereignisse bei den erkrankten Familienmitgliedern IV/6 bzw. IV/3 und IV/8 begrenzen das Intervall distal und proximal. Gemäß den Datenbanken NCBI und Ensembl schließt dieser Locus 40 Gene ein, von denen 4 nur vorhergesagte Gene waren. Durch Aktualisierungen der Datenbanken sind diese Gene, außer LOC91561, seit 2006 in den Status 'bekanntes Gen' ('known gene') gewechselt.

5.4 Kandidatengene im LVNC-Locus auf Chromosom 11p15

5.4.1 Mutationsanalyse der Gene im Locus

Der krankheitsassoziierte Locus schließt unter anderem auch das Gen des Z-Scheiben-Proteins *CSRP3* ein. Zu Beginn der Untersuchung des Locus sind von Geier et al. 3 *CSRP3*-Mutationen veröffentlicht worden, die für hypertrophe Kardiomyopathie verantwortlich sind [33]. Bei der Familie LVNC-105 ist keine Kopplungsanalyse mit dem *CSRP3*-Locus durchgeführt worden, weil er als Kardiomyopathie-Locus vorher nicht bekannt war. Aufgrund der Kopplungsanalyse wurden die Exonbereiche von *CSRP3* als erstes sequenziert.

Nachdem bei der Auswertung der Sequenzen keine Mutation in *CSRP3* gefunden wurde, war *PIK3C2A* das nächst wahrscheinliche Kandidatengen. Hertig et al. haben gezeigt, dass *NRG-1* und *IGF-I* über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg (PI3K), und *PIK3C2A* ist ein Teil davon, die Trabekularisierung des Myokards steuern [41]. Desweiteren wird *PIK3C2A* durch verschiedene Integrine reguliert, die für die normale kontraktile Funktion des Myokards notwendig sind [89, 119, 47]. Diese Funktion ist auch bei anderen Herzmuskelerkrankungen, wie z. B. DCM oder HCM, gestört. Doch auch bei diesem Gen konnte keine Mutation im kodierenden Bereich gefunden werden.

Weil nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die krankheitsverursachende Veränderung in einem anderen Gen des LVNC-Locus sein konnte, sind alle 40 Gene untersucht worden. Da Mutationen hauptsächlich in kodierenden Bereichen zu finden sind, wurden alle Exons und Exon/Intron-Grenzen sequenziert. Die Auswertung zeigte keine Mutation in diesen Genen.

Sehr seltene molekulare Defekte in Intronbereichen, die zu einem falschen Splei-

ßen der mRNA führen, können auch die Ursache einer Herzmuskelerkrankung sein. Ein Beispiel ist eine Mutation in einem Branch-Punkt der Spleißsequenzen des Gens *EYA4*, dass zur Deletion eines Introns und anschließenden Exons führt. Klinische Folge ist DCM und Gehörlosigkeit [106]. Deshalb sind auch nicht-kodierenden Bereiche nicht außer Acht gelassen worden. Jedoch zeigten die Sequenzierung der Introns von *CSRP3* und die Amplifikation des *PIK3C2A*-Transkripts keinen Unterschied zu Kontrollen. Die Analyse der Intronbereiche und der Spleißvarianten ist nur bei diesen zwei wahrscheinlichsten Kandidatengenen durchgeführt worden, weil nur ein Teil der Gene des Locus im Blut exprimiert ist und eine komplette genomische Sequenzierung des Locus im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

In dem chromosomalen Abschnitt sind höchst wahrscheinlich weitere Gen-kodierende Sequenzbereiche, die bisher unbekannt sind und deshalb in keiner Datenbank dazu Informationen vorhanden. Den Anfang zu einer umfassenden Analyse für die Identifikation neuer transkribierter Sequenzen auf Chromosom 11 haben Taylor et al. 2006 veröffentlicht [115]. Sie gaben jedoch keinen Hinweis auf mögliche weitere Kandidatengene im LVNC-assozierten Locus.

5.4.2 Expressionsuntersuchungen der Kandidatengene

Bei einer Herzmuskelerkrankung sind all die Gene von besonderem Interesse, die eine muskel- oder speziell herzmuskelspezifische Expression zeigen. Deshalb wurden alle Gene des neuen LVNC-Locus mit Hilfe der RT-PCR auf ihre Expression in verschiedenen humanen Geweben untersucht. Dabei zeigte außer *CSRP3* keines der Gene eine muskelspezifische Expression. Das Ergebnis dieser Analyse machte keine gezieltere Aussage über einen Zusammenhang der anderen Gene mit einer Erkrankung des Herzmuskels möglich.

Die Untersuchung der Expression in Lymphozyten von 22 Genen zeigte kein abnormales Expressionsverhalten bei 2 getesteten Patienten. Mit diesem Ergebnis ist jedoch keine Aussage über die Expression im kranken Herzen möglich, weil Mutationen in regulatorischen Bereichen auch herzspezifisch sein können. Ein positives Ergebnis in den Lymphozyten hätte aber auf Veränderungen hingedeutet.

Desweiteren sind Expressionsstudien in embryonalen Rattenherzen durchgeführt worden. Dabei ging es um die Beantwortung der Frage, ob bestimmte Kandidatengene des LVNC-Locus eine entwicklungsspezifische Expressionsveränderung zeigen, wie es z. B. bei *BMP10* der Fall ist, einem Kandidatengen für LVNC. Von den dabei untersuchten 9 orthologen Gene zeigten 2 einen Unterschied zwischen embryonalem und postnatalem/adultem Rattenherzen, aber eine Abhängigkeit mit der Phase der Trabekularisierung (E10.5 bis E15.5) wie bei *BMP10* war nicht zu erkennen.

Mit der Sequenzierung der Exons aller Gene in dem Lokus, die in den Datenbanken NCBI und Ensembl enthalten sind, ist eine Mutation in diesen kodierenden genomischen Bereichen ausgeschlossen. Eine anderen mögliche Ursache für LVNC ist eine pathologisch veränderte Expression eines Gens, die eine Auswirkung auf den Herzmuskel hat. Durch eine Mutation im regulatorischen Bereich kann es zu I) zu einer Nichtexpression des betroffenen Allels kommen, II) eine verminderte oder verstärkte Expression III) im embryonalen oder im adulten Herzen kommen. Die Untersuchung der Variante I ist mit einer allelspezifischen RT-PCR möglich. Dabei wird auf Grund von Sequenzunterschieden im kodierenden Bereich der beiden Allele die mRNA des Gens mit allelspezifischen Primern amplifiziert. Bei der Untersuchung des Lokus konnte diese Methode leider nicht angewendet werden, da es nur 3 Gene mit Sequenzpolymorphismen im Exon gab, diese Gene aber nicht im Blut exprimiert sind. Es stand nur lymphozytäre RNA zur Verfügung, so dass, für Variante II und III, die Expression weder im adulten noch im embryonalen Herzen analysiert werden konnte. Der Expressionsvergleich in den Lymphozyten zwischen erkrankten und gesunden Familienmitgliedern zeigte keinen Unterschied.

Die regulatorischen Bereiche, die Expression der Gene beeinflussen, sind im LVNC-Lokus unbekannt; nur der Enhancerbereich des Gene *CSRP3* ist bereits publiziert [36]. Auch hier konnte keine Veränderung festgestellt werden.

5.4.3 Bioinformatische Analysen

In dieser Arbeit sind verschiedene bioinformatische Methoden verwendet worden (EEL, Endeavour), um weitere Informationen und Vorhersagen zu dem LVNC-Lokus auf 11p15 zu erhalten. Bei der Familie LVNC-105 konnte die genetische Ursache auch mit Hilfe der hier verwendeten Programme nicht gefunden werden. Jedoch sind bioinformatische Methoden wichtig um die Fülle bereits gesammelter und in Datenbanken gespeicherter Informationen im Zusammenhang interpretieren zu können.

5.4.4 Weiterführende Analysen zum krankheitsassoziierten Lokus

Die bisherige Untersuchung des krankheitsassoziierten Lokus auf Chromosom 11p15 konnte nicht die genetische Ursache der Kardiomyopathie in der Familie LVNC-105 identifizieren.

Weitere Analysen neben der kompletten genomischen Sequenzierung sind nur durch die Untersuchung weiterer Familienmitglieder oder von betroffenem Herzgewebe möglich. Die Rekrutierung zusätzlicher Personen könnte den genomischen Bereich durch

weitere Rekombinationen mit Hilfe der Feinkartierung verkleinern. Im Herzgewebe kann direkt nach Expressionsunterschieden und Spleißvarianten einzelner Gene im Vergleich zu gesundem Gewebe gesucht werden. Mit dem für diese Arbeit zur Verfügung stehendem Material waren diese Analysen nicht möglich.

5.5 LVNC-Kandidatengene

Ein anderer Teil dieser Arbeit war die genetische Untersuchung von 63 nicht verwandten Indexpatienten mit isolierter LVNC. Bisher gibt es für diese Herzmuskelerkrankung kein ‘Hauptkrankheitsgen’, sondern nur sehr wenige, vereinzelte Fälle mit bekannter genetischer Ursache. Die durchgeführte Untersuchung verschiedener Kandidatengene in einem großen Patientenkollektiv mit adulter LVNC offenbarte neue Krankheitsgene mit Mutationen bei einem großen Anteil der Indexpatienten. Vorangegangene Screenings beinhalteten viele Patienten mit infantiler LVNC, wodurch sich diese Untersuchung von den bisherigen unterscheidet [22, 56].

5.5.1 Sequenzierung bekannter LVNC-Kandidatengene

Die Sequenzierung aller kodierenden Bereiche und der Intron/Exon-Grenzen der 4 LVNC-Kandidatengene *LMNA*, *LDB3*, *BMP10* und *Nkx2.5* zeigte auch in dieser Untersuchung, dass nur selten Mutationen in diesen Genen Ursache für ‘Linksventrikuläre Noncompaction’ sind. Es wurde bei 63 Indexpatienten nur eine Mutation in dem Z-Scheiben-Protein *LDB3* gefunden. Der Aminosäureaustausch V635I ist in einer der 3 LIM-Domänen des Proteins und könnte die Protein-Protein-Interaktion mit Proteinkinase C (PKC) verändern [126]. Dies ist bereits von Arimura et al. bei einer DCM-Mutation (D626N) in einer benachbarten LIM-Domäne gezeigt worden [6]. Die genetische Veränderung kann in der Familie von der, durch einen Unfall verstorbenen, Mutter weiter gegeben worden sein oder es handelt sich um eine de novo-Mutation beim Indexpatienten. Diese Frage konnte nicht geklärt werden, da kein genetisches Material der Großeltern vorliegt.

Die Aminosäuresubstitution Q22R in *Nkx2.5* ist durch die genetische Analyse der Eltern des Patienten als LVNC-Mutation ausgeschlossen worden, weil die Sequenzvariation von der gesunden Mutter weitergegeben worden ist. Das negative Ergebnis in den 230 gesunden Kontrollen zeigt, dass es ein sehr seltener Polymorphismus ist.

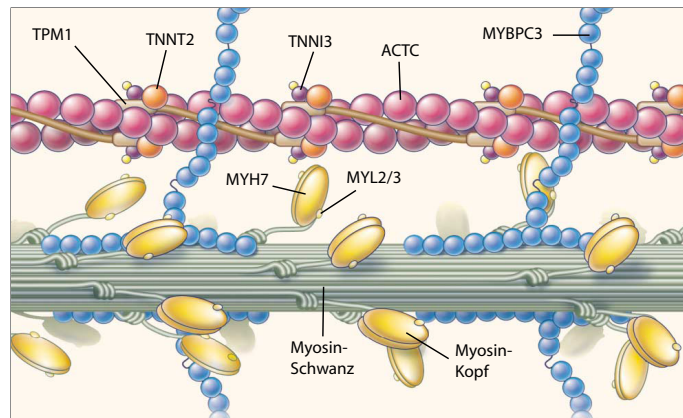


Abbildung 5.1: Lokalisation der Proteine im Sarkomer. (verändert nach [112]).

5.5.2 Gene sarkomerer Proteine als neue LVNC-Krankheitsgene

Die Untersuchung von Genen sarkomerer Proteine auf Veränderungen bei LVNC-Indexpatienten zeigt bei 19 % der 63 Patienten Mutationen in diesen Genen (*MYH7*, *ACTC*, *TNNT2*, *TPM1*), die somit relativ häufig sind.

MYH7

In dem Anteil von LVNC-Patienten mit Mutationen in sarkomeren Proteinen entfielen allein 7 Mutationen (60%) auf *MYH7*. Dabei konzentrieren sich 6 Mutationen auf einen kleinen Bereich in der ATP-Bindungsdomäne. Aufgrund der Eigenschaften und Lage der Aminosäuren kann von einer verminderten ATP-Bindung und -Hydrolyse der mutierten Myosin-Proteine ausgegangen werden und damit von einer veränderten Krafterzeugung in den Kardiomyozyten.

Zwei Mutationen, 818+1G>A und 818+3G>C, sind in der Donorspleißstelle des Intron 8. Es sind die ersten Speißstellenmutationen in *MYH7* bei Patienten mit Herz- oder Skelettmuskelerkrankungen, die bisher gefunden wurden (OMIM, CardioGenomics). In den Lymphozyten des Patientenbluts sind verschiedene Spleißvarianten des *MYH7*-Transkripts nachgewiesen worden, wobei eins ein vorzeitiges Stopp-Kodon bewirkt. Ob es translatiert wird und welche Auswirkung das trunkierte Protein auf die Sarkomerstruktur hätte, konnte ohne Herzmuskelgewebe eines Patienten nicht untersucht werden. So konnte auch nicht getestet werden, ob durch die Spleißstellenmutationen eine Haploinsuffizienz der zugrunde liegende Mechanismus ist oder ein dominant-negativer Effekt vorliegt, wie er bei den anderen gefundenen Substitutionen anzunehmen ist.

Eine weitere Mutation befindet sich im Myosinschwanz. Von dieser Domäne gibt es keine 3D-Kristallstruktur, so dass hier die funktionelle Interpretation schwierig ist.

Die Aminosäuresubstitution Arg1359Cys hat aber sehr wahrscheinlich Auswirkungen auf das Myofibrillenassembly oder es stört die Interaktionen mit Myosinfilament-bindenden Proteinen. Erkenntnisse über die tatsächlichen Effekte der Mutationen können nur aus Gewebeproben der Patienten gewonnen werden. Ein ATPase-Aktivitätstest und eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Sarkomerstruktur durchgeführt werden.

Mutationen der verschiedenen Herzmuskelerkrankungen sind nicht auf bestimmte Domänen von *MYH7* beschränkt, sondern über das gesamte Protein verteilt (Abb. 4.17, S. 55). Deshalb ist es nicht außergewöhnlich, dass neben der Häufung der LVNC-Mutationen in der ATP-Bindungsdomäne eine Mutationen in der Schwanz-Domäne zu finden ist.

ACTC

Die Glu101Lys Missensemutation in *ACTC*, die bei 2 Indexpatienten gefunden wurde, war bereits als genetische Ursache der apikalen HCM bekannt [4, 82]. Gleichzeitig mit der in dieser Dissertation beschriebenen Untersuchung ist von Monserrat et al. eine Veröffentlichung erschienen, dass Familienmitglieder einer bereits beschriebenen Familie mit vererbter apikaler HCM mit Glu101Lys eher die Kriterien einer LVNC erfüllen [73]. Der Aminosäureaustausch Glu101Lys befindet sich in einem Bereich des Aktin-Moleküls, das sich gegenüber des Myosinkopfes befindet. Die fehlende negative Ladung des Glu101 verursacht eine Schwächung der Aktomyosin-Bindung [82]. In einem Zell-expressionssystem zeigte sich der primäre Effekt des Glu101Lys in einer langsameren Bewegung und reduzierten durchschnittlichen Kraft. Diese Defizite auf molekularer Ebene scheinen ausreichend für eine pathologische Veränderung des Myokards [17].

TNNT2

Troponin T ist die Tropomyosin- und Aktin-bindende Untereinheit des Troponin-Komplexes im dünnen Muskelfilament. Dieser Komplex reguliert die Muskelkontraktion in Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration. Die Arg131Trp-Missensemutation befindet sich in der Schwanz-Domäne, die für die kritische Interaktion von Troponin-Komplex und Tropomyosin verantwortlich ist (Abb. 5.2, residues 70-170) [87]. Veränderungen in dieser Domäne haben Auswirkungen auf Faltung und Stabilität von *TNNT2* [42, 43]. Die Arg131Trp-Mutation ist bereits in einer Familie mit vererbter DCM gefunden worden [72], während die direkt daneben liegende Arg130Cys-Mutation bei einem HCM-Patienten vorhanden war [117]. Der Arg131Trp-Austausch kann somit zu DCM oder LVNC führen.

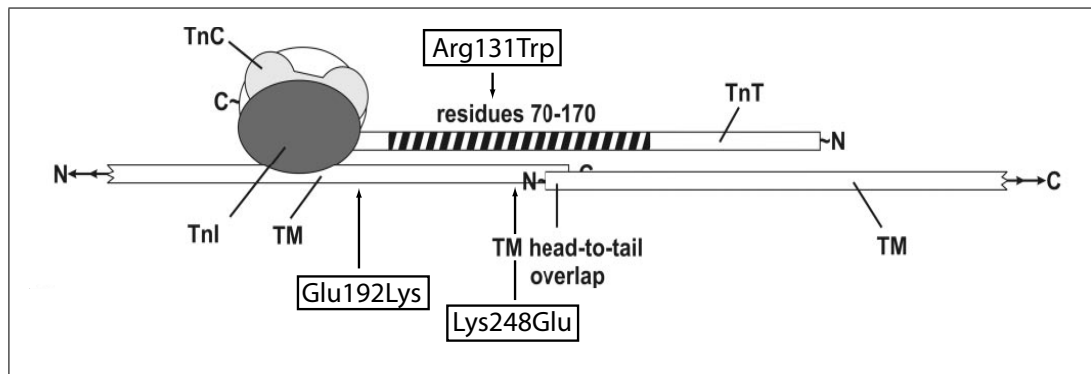


Abbildung 5.2: LVNC-Mutationen in den regulatorischen Proteinen des dünnen Filaments. Dargestellt sind der Troponin-Komplex (TnT/TnI/TnC) und das filamentbildende α -Tropomyosin (TM) (verändert nach [87]).

TPM1

Das kardiale α -Tropomyosin (*TPM1*) ist eines der regulatorischen Proteine im dünnen Filament. Die durch den Troponin-Komplex vermittelte Ca^{2+} -abhängige Bewegung des Tropomyosins blockiert oder öffnet die Myosin-Bindungsstellen des Aktins. Dieser regulatorische Mechanismus ist essentiell für die Muskelkontraktion und -relaxation. Es sind bereits 13 Mutationen in diesem Gen bekannt, die HCM (11) und DCM (2) (CardioGenomics) verursachen [116, 84]. Die bei einem LVNC-Indexpatienten gefundene Glu192Lys-Substitution ist bereits vorher bei einem Patienten mit HCM und Vorhof-septumdefekt gefunden worden ('CardioGenomics'). Die zweite Mutation (Lys248Glu) ist neu und konnte durch die Vererbung in der Familie als LVNC-verursachende Mutation bestätigt werden.

Beide Veränderungen befinden sich in der Troponin-Bindungsdomäne [91, 122]. Umfangreiche funktionelle Untersuchungen zu zwei HCM-Mutationen (Asp175Asn und Glu180Gly) in der Nähe von Glu192 zeigen in einem in vitro Motility-Assay keine Änderung in Filamentbewegung und -geschwindigkeit, aber in der Ca^{2+} -Sensitivität, vermutlich durch eine veränderte Interaktion mit Troponin T [13]. Das Mausmodell der Glu180Gly-Mutante zeigt eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität und einen verdickten Herzmuskel wie bei einer HCM [93]. Lys248 liegt in der Nähe des C-terminalen Endes, das mit dem N-Terminus des nächsten Tropomyosins überlappt [65].

Klinischer Phänotyp

Zu einigen LVNC-Indexpatienten mit sarkomeren Mutationen waren auch klinische Daten und DNA von Verwandten vorhanden. In allen Familien bestand eine 100%-ige Penetranz, das heißt alle genetisch betroffenen Familienmitglieder waren klinisch auffällig. Ein 2-jähriger Junge mit Mutation (LVNC-107, III/3, Abb. 4.15) zeigte neonatal

kein sicher auffälliges Myokardium, jedoch konnte nach 2 Jahren die Diagnose LVNC gestellt werden. Ein Teil der LVNC-Patienten war asymptomatisch, aber sobald die Erkrankung symptomatisch wurde, waren die Individuen schwer betroffen, hauptsächlich mit Herzversagen und thrombembolischen Ereignissen. Arrhythmien waren selten.

5.5.3 Sequenzvariation in *MYL2*

Die Substitution Ala13Thr kosegregiert in der Familie LVNC-102 nicht mit der Erkrankung und ist deshalb nicht krankheitsverursachend (Abb. 4.24, S. 59). Diese Sequenzvariation ist bei einem Einzelpatienten mit HCM als Mutation veröffentlicht worden und konnte in 720 Kontrollchromosomen aus dieser und der Studie von Poetter et al. nicht nachgewiesen werden [92]. Da die Missensemutation nicht die genetische Ursache der LVNC ist, handelt sich anscheinend bei um einen Polymorphismus, der jedoch sehr selten ist.

5.5.4 Mutationen in sarkomeren Proteinen führen zu verschiedenen Kardiomyopathien

Aminosäureaustausche in demselben sarkomeren Protein können unterschiedliche Kardiomyopathien hervorrufen. Es gibt unterschiedliche Interpretationen zu den Mutationen in *MYH7*. Blair et al. meinen, dass wenn Mutationen in der Schwanz- und in der Kopf-Domäne HCM hervorrufen, die letztendliche Ausprägung der Kardiomyopathie in einen jeweils gemeinsamen Pathway führt [14]. Mogensen et al. äußern, dass ein Zusammenspiel aus sarkomeren Mutationen, 'modifizierenden Genen' und nicht genetischen Faktoren der Umwelt (z. B. höhere Anfälligkeit für Viren und Toxine) für die heterogene Erscheinung der Herzmuskelerkrankungen verantwortlich sein kann [72]. Es können sogar identische Mutationen zu unterschiedlichen Kardiomyopathien führen. Ein Beispiel ist der Arg243His-Austausch in *MYH7*, der einerseits in Familien mit apikaler HCM und andererseits in einer der hier untersuchten Familien mit LVNC (LVNC-107) gefunden wurde. Von den in dieser Arbeit untersuchten Patienten erfüllt die LVNC-Indexpatientin mit der Arg131Trp-Substitution in *TNNT2* auch Kriterien der DCM (EF↓, LVED↑). Damit stimmt der Phänotyp dieser Patientin teilweise mit der DCM-Erkrankung einer bereits publizierten Familie mit der selben Arg131Trp-Substitution überein.

Die gefundenen LVNC-Mutationen in unterschiedlichen sarkomeren Proteinen zeigen, dass nicht nur bei der HCM und DCM verschiedene genetische Ursachen zu einem bestimmten klinischen Phänotyp führen. Funktionelle in vitro-Analysen von Robinson et al. zu Ca^{2+} -Bindung und ATPase-Aktivität bei ausgewählten HCM- und DCM-

Mutationen zeigen, dass die Mutation in *TNNT2* (Arg131Trp) außer einer direkten verringerten Ca^{2+} -Bindung auch sekundär eine erniedrigte ATPase-Aktivität zur Folge hat [99]. Daneben haben die LVNC-Mutationen in *MYH7* Auswirkungen auf ATP-Bindung und -Hydrolyse. Diese Effekte deuten auf eine gemeinsame funktionelle Störung durch die LVNC-Mutationen hin.

5.5.5 Störung der myokardialen Entwicklung

Veröffentlichungen grundlegender Untersuchungen zu Trabekelentstehung und Herzmuskelzellgestalt könnten Hinweise auf die molekularen Zusammenhänge der Entstehung einer Kardiomyopathie sein. Auman et al. zeigten im Zebrafisch, dass sich während der Herzkammerentwicklung die Zellmorphologie ändert. Ihr Modell lässt darauf schließen, dass sogar kleinste Änderungen der Kontraktilität durch Mutationen in sarkomeren Proteinen zu anomaler Zellmorphologie führen können, die Auswirkungen auf die Kammermorphologie haben [7].

Der Trabekulationsdefekt einer *Notch1*-Mausmutante ähnelt dem Phänotyp von LVNC-Patienten [37]. Während der frühen myokardialen Entwicklung teilt sich die Herzwand in eine äußere kompakte Zone mit starker Proliferation und in eine innere, trabekularisierte Zone mit erhöhter Differenzierung. Das richtige Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der Kardiomyozyten scheint entscheidend für die Ventrikelentwicklung zu sein. Bei der *Notch1*-Mausmutante ist die Umwandlung des einfachen myokardialen Epithels in kompaktes und trabekularisiertes Myokard und die Aufrechterhaltung der proliferierenden Trabekelkardiomyozyten während der Umwandlung zerstört. Zu Downstream-Effektoren von *Notch1* gehören auch *BMP10* und *Nkx2.5*.

Die bisherigen Erkenntnisse aus Tiermodellen reichen jedoch nicht aus, um zu klären, wie Mutationen in sarkomeren Proteinen in die myokardiale Entwicklung eingreifen und zu LVNC führen können.

5.6 Tiermodelle und weitere Kandidatengene

Tiermodelle mit einem Herzphänotyp, die der humanen LVNC ähneln, sind eine Möglichkeiten zu sehen, welche genetischen Defekte zu der typischen Morphologie des hypertrabekularisierten Myokards führen können.

Es gibt bereits verschiedene knock-out(ko)-Mäuse, die ein Fehlen der Kompaktierung des Myokards während der Embryonalentwicklung im Vergleich zu Wildtyp-Geschwister zeigen, wie die ko-Mäuse des Transkriptionsfaktors *FKBP12*, des mesodermspezifischen Transkripts (*MEST*) und des Tumornekrosefaktor- α -Enzyms (*TACE*)

[110, 57, 109]. Der Herzphänotyp dieser ko-Embryos ist jedoch nicht auf die fehlende Kompaktierung beschränkt, sondern es ist Teil eines komplexen Herzfehlers mit unterschiedlicher Ausprägung. Häufige Anomalien sind Ventrikel- oder Atriumseptumdefekte und rechter Doppelausstromventrikel. Selten treten auch Veränderungen in anderen Organen auf (z. B. *TACE*). Alle Mäuse mit komplettem KO versterben vor der Geburt und die morphologischen Untersuchungen konnte nur während der Embryonalentwicklung im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern vorgenommen werden.

Funktionelle KOs, die auf das Herz begrenzt sind, können teilweise bessere Aussagen über die weitere Entwicklung des Herzphänotyps machen, da sie nicht unbedingt embryonal lethal sind. Ein Beispiel ist der Transkriptionsfaktor *Nkx2.5*. Der komplette Knockout ist mit einer gehemmten Herzmorphogenese früh embryonal lethal [67, 114]. Die *Nkx2.5*-Mäuse mit funktionellem KO, der auf die Ventrikel begrenzt ist durch eine MLC2v-cre-vermittelte Rekombination, zeigen auch im adulten Zustand ein nicht kompaktes Myokard [88].

In den humanen orthologen Genen kann eine Mutationssuche bei LVNC-Patienten sinnvoll sein, da eine krankheitsverursachende Mutation zu einem inaktiven oder fehlendem Protein wie beim KO im Tiermodell führt. In allen Fällen ist es schwer einzuschätzen, ob Mutationen im jeweiligen Gen beim Menschen eine isolierte LVNC verursachen können. In dieser Arbeit sind aus einem Mausmodell nur die Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5* und *BMP10* sequenziert worden. Diese beiden Gene wiesen bei den LVNC-Indexpatienten keine Mutation auf.

Ein weiteres Tiermodell ist der Zebrafisch. Die Untersuchung zu orthologen Genen mit Morpholino-Antisense-Oligomeren (Morpholinos) kann schneller durchgeführt werden als die Generierung von KO-Mäusen [113]. Es liegen bereits Ergebnisse zu den Genen *LDB3* und *TAZ* vor. Der knock-down der Gene zeigt jeweils einen deutlich veränderten Herzphänotyp. Im Vergleich mit dem Wildtyp sind Veränderungen der Herzmuskelwand zu sehen, aber eine eindeutige Trabekelstruktur ist nicht zu erkennen.

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die genetische Ursache der LVNC in der Familie LVNC-105 kann in der Zukunft nur durch neue zusätzliche Informationen oder Methoden weiter untersucht werden. Wenn durch die späteren Analysen der molekulare Defekt gefunden wird, ist eine weitere genetische Ursache der LVNC bekannt und darauf aufbauende Untersuchungen könnten eine Erklärung zur Pathogenese dieser Erkrankung in der Familie LVNC-105 geben.

Die Analyse von LVNC-Kandidatengenen bei 63 Indexpatienten bestätigte bisherige Veröffentlichungen, dass Mutationen in den bisher bekannten Krankheitsgenen selten

ursächlich für LVNC sind. Mutationen in Genen sarkomerer Protein sind dagegen in 19 % der adulten LVNC-Patienten für die Erkrankung verantwortlich. Die Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen in sarkomeren Proteinen nicht nur zur hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathie führen, sondern auch LVNC zur Folge haben. Der molekulare Mechanismus, der zu 3 unterschiedlichen Herzmuskelerkrankungen bei gleichen oder ähnlichen genetischen Voraussetzungen führt, ist noch ungeklärt. Zur Untersuchung der pathologischen Mechanismen können Mausmodell mit den knock-ins der hier beschriebenen Mutationen dienen.

Anhang A

Gen-Liste des LVNC-Lokus

Symbol	Beschreibung	DNA- Sequ.	Expr. in hum.		Expr.-test	
			Herz	Lymph.	Pat.‡	rHerz§
RPS13	ribosomal protein S13		+	+		
PIK3C2A	phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide	+	+	+	+	+
LOC91561*	similar to ribosomal protein S2		+	+		
NUCB2	nucleobindin 2	+	+	+	+	+
Q7Z3M6*	hypothetical protein DKFZp686O24166	+		+		
KCNJ11	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, m. 11	+	+		+	+
ABCC8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), m. 8	+			+	+
USH1C	Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)	+	+		+	
OTOG	otogelin					
MYOD1	myogenic differentiation 1	+			+	
KCNC1	potassium voltage-gated channel, Shaw-rel. subfamily, m. 1	+			+	
SERGEF	secretion regulating guanine nucleotide exchange factor	+	+	+	+	
TPH1	tryptophan hydroxylase 1 (tryptophan 5-monooxygenase)	+			+	
SAAL1	serum amyloid A-like 1	+	+	+		
SAA3P**	serum amyloid A3 pseudogene		+			
MRGPRX3	MAS-related GPR, m. X3	+				
MRGPRX4	MAS-related GPR, m. X4	+		+		
LOC645312*	similar to Glycolipid transfer protein (GLTP)	+				
LOC494141*	similar to mitochondrial carrier triple repeat 1	+				
SAA4	serum amyloid A4, constitutive					
SAA2	serum amyloid A2					
FAM10A5**	family with sequence similarity 10, m. A5	+	+	+	+	
SAA1	serum amyloid A1	+				
HPS5	Hermansky-Pudlak syndrome 5	+	+	+	+	
GTF2H1	general transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa	+	+	+	+	
LDHA	lactate dehydrogenase A		+	+	+	+
LDHC	lactate dehydrogenase C					
LDHAL6A	lactate dehydrogenase A-like 6A	+				
TSG101	tumor susceptibility gene 101	+	+	+	+	
UEVLD	UEV and lactate/malate dehydrogenase domains	+	+	+	+	
SPTY2D1	SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1 (S.cerev.)	+	+	+	+	
TMEM86A	transmembrane protein 86A	+	+	+		
IGSF22	immunoglobulin superfamily, m. 22	+			+	
PTPN5	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5 (striatum-enriched)	+	+		+	
MRGPRX1	MAS-related GPR, m. X1	+		+		
MRGPRX2	MAS-related GPR, m. X2	+		+		
ZDHHC13	zinc finger, DHHC-type containing 13	+	+	+	+	+
CSRP3	cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)	+	+		+	+
E2F8	E2F transcription factor 8	+	+	+	+	+
NAV2	neuron navigator 2	+	+		+	+

Tabelle A.1: Liste der Gene im LVNC-assoziierten Locus auf Chromosom 11p15. Diese Liste wurde aus den Einträgen der Datenbanken NCBI und Ensembl zusammengestellt. ‡ Patienten der Familie LVNC-105, § embryonale und adulte Rattenherzen, * vorhergesagtes Gen, ** Pseudogen, m.: member.

Anhang B

Publikationen

Probst, S.; de Hoog, G. S.; Gräser, Y.: Development of DNA markers to explore host shifts in dermatophytes. Stud Mycol 47 (2003), 57-74

Sasse-Klaassen, S.; Probst, S.; Gerull, B.; Oechslin, E.; Nürnberg, P.; Heuser, A.; Jenni, R.; Hennies, H. C.; Thierfelder, L.: Novel gene locus for autosomal dominant left ventricular noncompaction maps to chromosome 11p15. Circulation 109 (2004), Jun, Nr. 22, S. 2720-3

Ellinor, P.T.; Sasse-Klaassen, S.; Probst, S.; Gerull, B.; Shin, J.T.; Toepfel, A.; Heuser, A.; Michely, B.; Yoerger, D.M.; Song, B.-S.; Pilz, B. ; Krings, G.; Coplin, B.; Lange, P.E.; Dec, G.W.; Hennies, H.C.; Thierfelder, L.; MacRae, C.A.: A novel locus for dilated cardiomyopathy, diffuse myocardial fibrosis, and sudden death on chromosome 10q25-26. J Am Coll Cardiol 48 (2006), Jul, Nr. 1, S. 106-11

Klaassen, S.*; Probst, S.*; Oechslin, E.; Gerull, B.; Krings, G.; Schuler, P.; Greutmann, M.; Hürlimann, D.; Yegitbasi, M.; Pons, L.; Gramlich, M.; Drenckhahn, J.-D.; Heuser, A.; Berger, F.; Jenni, R.; Thierfelder, L.: Mutations in Sarcomere Protein Genes MYH7, ACTC and TNNT2 in Isolated Left Ventricular Noncompaction. Circulation (eingereicht)

* Die Autoren haben zu gleichen Teilen zur Arbeit/Veröffentlichung beigetragen.

Abkürzungen

In dieser Arbeit werden die international üblichen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten (Système International d'Unités) verwendet. Die in der Arbeit aufgeführten Gen- und Proteinnamen sowie Artnamen sind *kursiv* geschrieben.

Die Beschreibung von Sequenzvariationen erfolgte nach den Richtlinien der 'Human Genom Variation Society' (http://www.hgmd.cf.ac.uk/docs/mut_nom.html).

Abkürzung	Erklärung
ACTC	kardiales α -Aktin
apikal	Herzspitze
AHA	American Heart Association
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ASD	atrialer Septumdefekt
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Clone
BMP10	bone morphogenetic protein 10
C.e.	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)
cM	Centimorgan (Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen 2 Loci; 1 cM-Abstand entspricht 1 %)
DCM	dilatative Kardiomyopathie (vergrößertes Herz)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHPLC	<u>D</u> enaturing <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
D.m.	<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruchtfliege)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat-Set (dATP,dTTP,dGTP,dCTP)
D.r.	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion (Auswurf fraktion)
G.g.	<i>Gallus gallus</i> (Huhn)
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie (verdickter Herzmuskel)

H.s.	Homo sapiens (Mensch)
in silico ...	mit einem Computer durchgeführt ...
kb	Kilobasen
LBD3	LIM-binding domain protein 3 (syn. ZASP)
LMNA	Lamin A/C
Lsg.	Lösung
LVED	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVNC	Linksventrikuläre Noncompaction
Mb	Megabase
min	Minute
M.m.	Mus musculus (Hausmaus)
Morpholino	Morpholino-Antisense-Oligomer
MYBPC3	kardiales Myosin bindendes Protein 3
MYH7	kardiales β -Myosin Heavy Chain
MYL2	regulatorische Myosinleichtkette
MYL3	essentielle Myosinleichtkette
Nkx2.5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)
PS	Pulmonalklappenstenose
qRT	quantitative reverse Transkription
RCM	restriktive Kardiomyopathie (verminderte Dehnbarkeit des Myokards)
R.n.	Rattus norvegicus (Wanderratte)
SAP	<u>S</u> hrimp <u>A</u> lkaline <u>P</u> hosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ukleotid <u>P</u> olymorphism
STR	Short Tandem Repeat (Mikrosatellit)
θ	Rekombinationsrate
T_a	Annealingtemperatur
TF	Transkriptionsfaktor
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
TNNI3	kardiales Troponin I
TNNT2	kardiales Troponin T
TPM1	α -Tropomyosin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Prof. Ludwig Thierfelder, Leiter der Arbeitsgruppe „Kardiovaskuläre Molekulargenetik“ am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin, der mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe gab.

Ganz besonders möchte ich Dr. Sabine Klaassen danken. Sie stellte mir das Thema zur Verfügung und hat mich während der gesamten Zeit sehr gut betreut. Ich danke ihr für ihre Hilfe und für die Fülle an Erläuterungen und Hintergrundinformationen. Das verständnisvolle Verhältnis hat sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe. Arnd Heuser, Brenda Gerull, Jörg Drenckhahn, Michael Gramlich, Sigrid Milan, Ilona Trippmacher und alle anderen sorgten für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Dr. Eva Klopocki von Institut für Medizinische Genetik der Charité für die Durchführung der Array-CGH.

Meinen herzlichsten Dank richte ich an meinen Ehemann, meine Kinder und meine Eltern, weil sie so geduldig waren und ich stets auf ihre Unterstützung bauen konnte.

Literaturverzeichnis

- [1] *Current Protocols of Molecular Biology*. Wiley InterScience, 2001
- [2] ADIE, Euan A. ; ADAMS, Richard R. ; EVANS, Kathryn L. ; PORTEOUS, David J. ; PICKARD, Ben S.: Speeding disease gene discovery by sequence based candidate prioritization. In: *BMC Bioinformatics* 6 (2005), 55. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-6-55>. – DOI 10.1186/1471-2105-6-55
- [3] AERTS, Stein ; LAMBRECHTS, Diether ; MAITY, Sunit ; LOO, Peter V. ; COESSENS, Bert ; SMET, Frederik D. ; TRANCHEVENT, Leon-Charles ; MOOR, Bart D. ; MARYNEN, Peter ; HASSAN, Bassem ; CARMELIET, Peter ; MOREAU, Yves: Gene prioritization through genomic data fusion. In: *Nat Biotechnol* 24 (2006), May, Nr. 5, 537-44. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1203>. – DOI 10.1038/nbt1203. – (<http://homes.esat.kuleuven.be/bioiuser/endeavour/endeavour.php>)
- [4] ARAD, Michael ; PENAS-LADO, Manual ; MONSERRAT, Lorenzo ; MARON, Barry J. ; SHERRID, Mark ; HO, Carolyn Y. ; BARR, Scott ; KARIM, Ahmad ; OLSON, Timothy M. ; KAMISAGO, Mitsuhiko ; SEIDMAN, JG ; SEIDMAN, Christine E.: Gene mutations in apical hypertrophic cardiomyopathy. In: *Circulation* 112 (2005), Nov, Nr. 18, 2805-11. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.547448>. – DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.547448
- [5] ARBER, S ; HALDER, G ; CARONI, P: Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. In: *Cell* 79 (1994), Oct, Nr. 2, S. 221-31
- [6] ARIMURA, Takuro ; HAYASHI, Takeharu ; TERADA, Hajime ; LEE, Su-Yeoun ; ZHOU, Qiang ; TAKAHASHI, Megumi ; UEDA, Kazuo ; NOUCHI, Tatsuhito ; HOHDA, Shigeru ; SHIBUTANI, Makoto ; HIROSE, Masao ; CHEN, Ju ; PARK, Jeong-Euy ; YASUNAMI, Michio ; HAYASHI, Hideharu ; KIMURA, Akinori: A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. In: *J Biol Chem* 279 (2004),

- Feb, Nr. 8, 6746-52. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M311849200>. – DOI 10.1074/jbc.M311849200
- [7] AUMAN, Heidi J. ; COLEMAN, Hope ; RILEY, Heather E. ; OLALE, Felix ; TSAI, Huai-Jen ; YELON, Deborah: Functional Modulation of Cardiac Form through Regionally Confined Cell Shape Changes. In: *PLoS Biol* 5 (2007), Feb, Nr. 3, e53. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050053>. – DOI 10.1371/journal.pbio.0050053
- [8] BARASH, Ilona A. ; MATHEW, Libby ; LAHEY, Michele ; GREASER, Marion L. ; LIEBER, Richard L.: Muscle LIM protein plays both structural and functional roles in skeletal muscle. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 289 (2005), Nov, Nr. 5, C1312-20. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00117.2005>. – DOI 10.1152/ajpcell.00117.2005
- [9] BARRESI, R ; BLASI, C D. ; NEGRI, T ; BRUGNONI, R ; VITALI, A ; FELISARI, G ; SALANDI, A ; DANIEL, S ; CORNELIO, F ; MORANDI, L ; MORA, M: Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. In: *J Med Genet* 37 (2000), Feb, Nr. 2, S. 102–7
- [10] BEJERANO, Gill ; PHEASANT, Michael ; MAKUNIN, Igor ; STEPHEN, Stuart ; KENT, W J. ; MATTICK, John S. ; HAUSSLER, David: Ultraconserved elements in the human genome. In: *Science* 304 (2004), May, Nr. 5675, 1321-5. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1098119>. – DOI 10.1126/science.1098119
- [11] BEJERANO, Gill ; SIEPEL, Adam C. ; KENT, W J. ; HAUSSLER, David: Computational screening of conserved genomic DNA in search of functional noncoding elements. In: *Nat Methods* 2 (2005), Jul, Nr. 7, 535-45. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0705-535>. – DOI 10.1038/nmeth0705-535
- [12] BIAGINI, Elena ; RAGNI, Luca ; FERLITO, Marinella ; PASQUALE, Ferdinando ; LOFIEGO, Carla ; LEONE, Ornella ; ROCCHI, Guido ; PERUGINI, Enrica ; ZAGNONI, Silvia ; BRANZI, Angelo ; PICCHIO, Fernando M. ; RAPEZZI, Claudio: Different types of cardiomyopathy associated with isolated ventricular noncompaction. In: *Am J Cardiol* 98 (2006), Sep, Nr. 6, 821-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.04.021>. – DOI 10.1016/j.amjcard.2006.04.021
- [13] BING, W ; KNOTT, A ; REDWOOD, C ; ESPOSITO, G ; PURCELL, I ; WATKINS, H ; MARSTON, S: Effect of hypertrophic cardiomyopathy mutations in human cardiac muscle alpha -tropomyosin (Asp175Asn and Glu180Gly) on the

- regulatory properties of human cardiac troponin determined by in vitro motility assay. In: *J Mol Cell Cardiol* 32 (2000), Aug, Nr. 8, 1489-98. <http://dx.doi.org/10.1006/jmcc.2000.1182>. – DOI 10.1006/jmcc.2000.1182
- [14] BLAIR, Edward ; REDWOOD, Charles ; JESUS OLIVEIRA, Marisa de ; MOOLMAN-SMOOK, JC ; BRINK, Paul ; CORFIELD, VA ; OSTMAN-SMITH, Ingegerd ; WATKINS, Hugh: Mutations of the light meromyosin domain of the beta-myosin heavy chain rod in hypertrophic cardiomyopathy. In: *Circ Res* 90 (2002), Feb, Nr. 3, S. 263–9
- [15] BLEYL, SB ; MUMFORD, BR ; THOMPSON, V ; CAREY, JC ; PYSHER, TJ ; CHIN, TK ; WARD, K: Neonatal, lethal noncompaction of the left ventricular myocardium is allelic with Barth syndrome. In: *Am J Hum Genet* 61 (1997), Oct, Nr. 4, S. 868–72
- [16] BONNE, G ; BARLETTA, MR D. ; VARNOUS, S ; BÉCANE, HM ; HAMMOUDA, EH ; MERLINI, L ; MUNTONI, F ; GREENBERG, CR ; GARY, F ; URTIZBEREA, JA ; DUBOC, D ; FARDEAU, M ; TONIOLO, D ; SCHWARTZ, K: Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. In: *Nat Genet* 21 (1999), Mar, Nr. 3, 285-8. <http://dx.doi.org/10.1038/6799>. – DOI 10.1038/6799
- [17] BOOKWALTER, Carol S. ; TRYBUS, Kathleen M.: Functional consequences of a mutation in an expressed human alpha-cardiac actin at a site implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Jun, Nr. 24, 16777-84. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M512935200>. – DOI 10.1074/jbc.M512935200
- [18] BOWLES, KR ; GAJARSKI, R ; PORTER, P ; GOYTIA, V ; BACHINSKI, L ; ROBERTS, R ; PIGNATELLI, R ; TOWBIN, JA: Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23. In: *J Clin Invest* 98 (1996), Sep, Nr. 6, S. 1355–60
- [19] BRANDNER, Katrin ; MICK, David U. ; FRAZIER, Ann E. ; TAYLOR, Rebecca D. ; MEISINGER, Chris ; REHLING, Peter: Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. In: *Mol Biol Cell* 16 (2005), Nov, Nr. 11, 5202-14. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-03-0256>. – DOI 10.1091/mbc.E05-03-0256

- [20] CHARRON, P ; DUBOURG, O ; DESNOS, M ; ISNARD, R ; HAGEGE, A ; BONNE, G ; CARRIER, L ; TESSON, F ; BOUHOUR, JB ; BUZZI, JC ; FEINGOLD, J ; SCHWARTZ, K ; KOMAJDA, M: Genotype-phenotype correlations in familial hypertrophic cardiomyopathy. A comparison between mutations in the cardiac protein-C and the beta-myosin heavy chain genes. In: *Eur Heart J* 19 (1998), Jan, Nr. 1, S. 139–45
- [21] CHEN, Hanying ; SHI, Shu ; ACOSTA, Lourdes ; LI, Weiming ; LU, Jonathan ; BAO, Shideng ; CHEN, Zhuang ; YANG, Zuocheng ; SCHNEIDER, Michael D. ; CHIEN, Kenneth R. ; CONWAY, Simon J. ; YODER, Mervin C. ; HANELINE, Laura S. ; FRANCO, Diego ; SHOU, Weinian: BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. In: *Development* 131 (2004), May, Nr. 9, 2219–31. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01094>. – DOI 10.1242/dev.01094
- [22] CHEN, Rui ; TSUJI, Tohru ; ICHIDA, Fukiko ; BOWLES, Karla R. ; YU, Xianyi ; WATANABE, Sayaka ; HIRONO, Keiichi ; TSUBATA, Shinichi ; HAMAMICHI, Yuji ; OHTA, Jun ; IMAI, Yasuharu ; BOWLES, Neil E. ; MIYAWAKI, Toshio ; TOWBIN, Jeffrey A. ; COLLABORATORS, Noncompaction study: Mutation analysis of the G4.5 gene in patients with isolated left ventricular noncompaction. In: *Mol Genet Metab* 77 (2002), Dec, Nr. 4, S. 319–25
- [23] CHIN, TK ; PERLOFF, JK ; WILLIAMS, RG ; JUE, K ; MOHRMANN, R: Isolated noncompaction of left ventricular myocardium. A study of eight cases. In: *Circulation* 82 (1990), Aug, Nr. 2, S. 507–13
- [24] CONNEALLY, PM ; EDWARDS, JH ; KIDD, KK ; LALOUEL, JM ; MORTON, NE ; OTT, J ; WHITE, R: Report of the Committee on Methods of Linkage Analysis and Reporting. In: *Cytogenet Cell Genet* 40 (1985), Nr. 1-4, S. 356–9
- [25] DAVIDSON, Eric H. ; MCCLAY, David R. ; HOOD, Leroy: Regulatory gene networks and the properties of the developmental process. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Feb, Nr. 4, 1475–80. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0437746100>. – DOI 10.1073/pnas.0437746100
- [26] DERMITZAKIS, Emmanouil T. ; REYMOND, Alexandre ; ANTONARAKIS, Stylianos E.: Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes. In: *Nat Rev Genet* 6 (2005), Feb, Nr. 2, 151–7. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1527>. – DOI 10.1038/nrg1527

- [27] ENGBERDING, R ; BENDER, F: Identification of a rare congenital anomaly of the myocardium by two-dimensional echocardiography: persistence of isolated myocardial sinusoids. In: *Am J Cardiol* 53 (1984), Jun, Nr. 11, S. 1733–4
- [28] FATKIN, D ; MACRAE, C ; SASAKI, T ; WOLFF, MR ; PORCU, M ; FRENNEAUX, M ; ATHERTON, J ; VIDAILLET, HJ ; SPUDICH, S ; GIROLAMI, U D. ; SEIDMAN, JG ; SEIDMAN, C ; MUNTONI, F ; MÜEHLE, G ; JOHNSON, W ; McDONOUGH, B: Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. In: *N Engl J Med* 341 (1999), Dec, Nr. 23, S. 1715–24
- [29] FEINBERG, AP ; VOGELSTEIN, B: In: *Anal. Biochem* 132 (1983), 6–13 S.
- [30] FEINBERG, AP ; VOGELSTEIN, B: In: *Addendum Anal. Biochem.* 137 (1984), 266–267 S.
- [31] FLASHMAN, Emily ; REDWOOD, Charles ; MOOLMAN-SMOOK, Johanna ; WATKINS, Hugh: Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. In: *Circ Res* 94 (2004), May, Nr. 10, 1279–89. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000127175.21818.C2>. – DOI 10.1161/01.RES.0000127175.21818.C2
- [32] FLAVIGNY, J ; RICHARD, P ; ISNARD, R ; CARRIER, L ; CHARRON, P ; BONNE, G ; FORISSIER, JF ; DESNOS, M ; DUBOURG, O ; KOMAJDA, M ; SCHWARTZ, K ; HAINQUE, B: Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy. In: *J Mol Med* 76 (1998), Mar, Nr. 3–4, S. 208–14
- [33] GEIER, Christian ; PERROT, Andreas ; OZCELIK, Cemil ; BINNER, Priska ; COUNSELL, Damian ; HOFFMANN, Katrin ; PILZ, Bernhard ; MARTINIAK, Yvonne ; GEHMLICH, Katja ; VEN, Peter F M. d. ; FÜRST, Dieter O. ; VORNWALD, Arnold ; HODENBERG, Eberhard von ; NÜRNBERG, Peter ; SCHEFFOLD, Thomas ; DIETZ, Rainer ; OSTERZIEL, Karl J.: Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. In: *Circulation* 107 (2003), Mar, Nr. 10, S. 1390–5
- [34] GERULL, Brenda ; GRAMLICH, Michael ; ATHERTON, John ; McNABB, Mark ; TROMBITÁS, Karoly ; SASSE-KLAASSEN, Sabine ; SEIDMAN, JG ; SEIDMAN, Christine ; GRANZIER, Henk ; LABEIT, Siegfried ; FRENNEAUX, Michael ; THIERFELDER, Ludwig: Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. In: *Nat Genet* 30 (2002), Feb, Nr. 2, 201–4. <http://dx.doi.org/10.1038/ng815>. – DOI 10.1038/ng815

- [35] GERULL, Brenda ; HEUSER, Arnd ; WICHTER, Thomas ; PAUL, Matthias ; BASSON, Craig T. ; MCDERMOTT, Deborah A. ; LERMAN, Bruce B. ; MARKOWITZ, Steve M. ; ELLINOR, Patrick T. ; MACRAE, Calum A. ; PETERS, Stefan ; GROSSMANN, Katja S. ; DRENCKHAHN, Jörg ; MICHELY, Beate ; SASSE-KLAASSEN, Sabine ; BIRCHMEIER, Walter ; DIETZ, Rainer ; BREITHARDT, Günter ; SCHULZE-BAHR, Eric ; THIERFELDER, Ludwig: Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. In: *Nat Genet* 36 (2004), Nov, Nr. 11, 1162-4. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1461>. – DOI 10.1038/ng1461
- [36] GOLDHAMER, DJ ; BRUNK, BP ; FAERMAN, A ; KING, A ; SHANI, M ; EMERSON, CP: Embryonic activation of the myoD gene is regulated by a highly conserved distal control element. In: *Development* 121 (1995), Mar, Nr. 3, S. 637–49
- [37] GREGO-BESSA, Joaquín ; LUNA-ZURITA, Luis ; MONTE, Gonzalo del ; BOLÓS, Victoria ; MELGAR, Pedro ; ARANDILLA, Alejandro ; GARRATT, Alistair N. ; ZANG, Heesuk ; MUKOUYAMA, Yoh-Suke ; CHEN, Hanying ; SHOU, Weinian ; BALLESTAR, Esteban ; ESTELLER, Manel ; ROJAS, Ana ; PÉREZ-POMARES, José M. ; POMPA, José L. l.: Notch signaling is essential for ventricular chamber development. In: *Dev Cell* 12 (2007), Mar, Nr. 3, 415-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.12.011>. – DOI 10.1016/j.devcel.2006.12.011
- [38] GRIGORENKO, Bella L. ; ROGOV, Alexander V. ; TOPOL, Igor A. ; BURT, Stanley K. ; MARTINEZ, Hugo M. ; NEMUKHIN, Alexander V.: Mechanism of the myosin catalyzed hydrolysis of ATP as rationalized by molecular modeling. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007), Apr, Nr. 17, 7057-61. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701727104>. – DOI 10.1073/pnas.0701727104
- [39] HALLIKAS, Outi ; PALIN, Kimmo ; SINJUSHINA, Natalia ; RAUTIAINEN, Reetta ; PARTANEN, Juha ; UKKONEN, Esko ; TAIPALE, Jussi: Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. In: *Cell* 124 (2006), Jan, Nr. 1, 47-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.042>. – DOI 10.1016/j.cell.2005.10.042. – (http://sysdb.cs.helsinki.fi/u/tkt_bsap/EELweb/)
- [40] HERMIDA-PRIETO, Manuel ; MONSERRAT, Lorenzo ; CASTRO-BEIRAS, Alfonso ; LAREDO, Rafael ; SOLER, Rafaela ; PETEIRO, Jesus ; RODRÍGUEZ, Esther ; BOUZAS, Beatriz ; ALVAREZ, Nemesio ; MUÑIZ, Javier ; CRESPO-LEIRO, Mari-sa: Familial dilated cardiomyopathy and isolated left ventricular noncompaction associated with lamin A/C gene mutations. In: *Am J Cardiol* 94 (2004), Jul,

- Nr. 1, 50-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.03.029>. – DOI 10.1016/j.amjcard.2004.03.029
- [41] HERTIG, CM ; KUBALAK, SW ; WANG, Y ; CHIEN, KR: Synergistic roles of neuregulin-1 and insulin-like growth factor-I in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and cardiac chamber morphogenesis. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Dec, Nr. 52, S. 37362–9
- [42] HINKLE, A ; GORANSON, A ; BUTTERS, CA ; TOBACMAN, LS: Roles for the troponin tail domain in thin filament assembly and regulation. A deletional study of cardiac troponin T. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Mar, Nr. 11, S. 7157–64
- [43] HINKLE, Ashley ; TOBACMAN, Larry S.: Folding and function of the troponin tail domain. Effects of cardiomyopathic troponin T mutations. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Jan, Nr. 1, 506-13. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209194200>. – DOI 10.1074/jbc.M209194200
- [44] HUBER, CG ; OEFNER, PJ ; BONN, GK: High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers. In: *Anal Biochem* 212 (1993), Aug, Nr. 2, 351-8. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1993.1340>. – DOI 10.1006/abio.1993.1340
- [45] ICHIDA, F ; HAMAMICHI, Y ; MIYAWAKI, T ; ONO, Y ; KAMIYA, T ; AKAGI, T ; HAMADA, H ; HIROSE, O ; ISOBE, T ; YAMADA, K ; KUROTOBI, S ; MITO, H ; MIYAKE, T ; MURAKAMI, Y ; NISHI, T ; SHINOHARA, M ; SEGUCHI, M ; TASHIRO, S ; TOMIMATSU, H: Clinical features of isolated noncompaction of the ventricular myocardium: long-term clinical course, hemodynamic properties, and genetic background. In: *J Am Coll Cardiol* 34 (1999), Jul, Nr. 1, S. 233–40
- [46] ICHIDA, F ; TSUBATA, S ; BOWLES, KR ; HANEDA, N ; UESE, K ; MIYAWAKI, T ; DREYER, WJ ; MESSINA, J ; LI, H ; BOWLES, NE ; TOWBIN, JA: Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. In: *Circulation* 103 (2001), Mar, Nr. 9, S. 1256–63
- [47] JANE-LISE, S ; CORDA, S ; CHASSAGNE, C ; RAPPAPORT, L: The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. In: *Heart Fail Rev* 5 (2000), Oct, Nr. 3, 239-50. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1009857403356>. – DOI 10.1023/A:1009857403356
- [48] JENNI, R ; GOEBEL, N ; TARTINI, R ; SCHNEIDER, J ; ARBENZ, U ; OELZ, O: Persisting myocardial sinusoids of both ventricles as an isolated anomaly: echo-

- cardiographic, angiographic, and pathologic anatomical findings. In: *Cardiovasc Intervent Radiol* 9 (1986), Nr. 3, S. 127–31
- [49] JENNI, R ; OECHSLIN, E ; SCHNEIDER, J ; JOST, C A. ; KAUFMANN, PA: Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy. In: *Heart* 86 (2001), Dec, Nr. 6, S. 666–71
- [50] JOHNSON, Mark T. ; ZHANG, Shaoxiong ; GILKESON, Robert ; AMEDURI, Rebecca ; CHEBOTAREV, Oleg ; KENTON, Alexander B. ; BOWLES, Karla R. ; TOWBIN, Jeffrey A. ; ROBIN, Nathaniel H. ; BROZOVICH, Frank ; HOIT, Brian D.: Intrafamilial variability of noncompaction of the ventricular myocardium. In: *Am Heart J* 151 (2006), May, Nr. 5, 1012.e7-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2006.01.021>. – DOI 10.1016/j.ahj.2006.01.021
- [51] JONES, AC ; AUSTIN, J ; HANSEN, N ; HOOGENDOORN, B ; OEFNER, PJ ; CHEADLE, JP ; O'DONOVAN, MC: Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. In: *Clin Chem* 45 (1999), Aug, Nr. 8 Pt 1, S. 1133–40
- [52] JUNG, M ; POEPPING, I ; PERROT, A ; ELLMER, AE ; WIENKER, TF ; DIETZ, R ; REIS, A ; OSTERZIEL, KJ: Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22. In: *Am J Hum Genet* 65 (1999), Oct, Nr. 4, S. 1068–77
- [53] KAMISAGO, M ; SHARMA, SD ; DePALMA, SR ; SOLOMON, S ; SHARMA, P ; McDONOUGH, B ; SMOOT, L ; MULLEN, MP ; WOOLF, PK ; WIGLE, ED ; SEIDMAN, JG ; SEIDMAN, CE: Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. In: *N Engl J Med* 343 (2000), Dec, Nr. 23, S. 1688–96
- [54] KARIBE, A ; TOBACMAN, LS ; STRAND, J ; BUTTERS, C ; BACK, N ; BACHINSKI, LL ; ARAI, AE ; ORTIZ, A ; ROBERTS, R ; HOMSHER, E ; FANANAPAZIR, L: Hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel alpha-tropomyosin mutation (V95A) is associated with mild cardiac phenotype, abnormal calcium binding to troponin, abnormal myosin cycling, and poor prognosis. In: *Circulation* 103 (2001), Jan, Nr. 1, S. 65–71
- [55] KENT, W J. ; SUGNET, Charles W. ; FUREY, Terrence S. ; ROSKIN, Krishna M. ; PRINGLE, Tom H. ; ZAHLE, Alan M. ; HAUSSLER, David: The human genome browser at UCSC. In: *Genome Res* 12

- (2002), Jun, Nr. 6, 996-1006. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.229102>.
Article published online before print in May 2002. – DOI 10.1101/gr.229102.
Article published online before print in May 2002
- [56] KENTON, Alexander B. ; SANCHEZ, Ximena ; COVELER, Karen J. ; MAKAR, Kimberly A. ; JIMENEZ, Shinawe ; ICHIDA, Fukiko ; MURPHY, Ross T. ; ELLIOTT, Perry M. ; MCKENNA, William ; BOWLES, Neil E. ; TOWBIN, Jeffrey A. ; BOWLES, Karla R.: Isolated left ventricular noncompaction is rarely caused by mutations in G4.5, alpha-dystrobrevin and FK Binding Protein-12. In: *Mol Genet Metab* 82 (2004), Jun, Nr. 2, 162-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.02.009>. – DOI 10.1016/j.ymgme.2004.02.009
- [57] KING, Tim ; BLAND, Yvette ; WEBB, Sandra ; BARTON, Sheila ; BROWN, Nigel A.: Expression of Peg1 (Mest) in the developing mouse heart: involvement in trabeculation. In: *Dev Dyn* 225 (2002), Oct, Nr. 2, 212-5. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.10142>. – DOI 10.1002/dvdy.10142
- [58] KLAMUT, HJ ; BOSNOYAN-COLLINS, LO ; WORTON, RG ; RAY, PN ; DAVIS, HL: Identification of a transcriptional enhancer within muscle intron 1 of the human dystrophin gene. In: *Hum Mol Genet* 5 (1996), Oct, Nr. 10, S. 1599–606
- [59] KLOPOCKI, Eva ; NEUMANN, Luitgard M. ; TÖNNIES, Holger ; ROPERS, Hans-Hilger ; MUNDLOS, Stefan ; ULLMANN, Reinhard: Ulnar-mammary syndrome with dysmorphic facies and mental retardation caused by a novel 1.28 Mb deletion encompassing the TBX3 gene. In: *Eur J Hum Genet* 14 (2006), Dec, Nr. 12, 1274-9. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201696>. – DOI 10.1038/sj.ejhg.5201696
- [60] KNÖLL, Ralph ; HOSHIJIMA, Masahiko ; HOFFMAN, Hal M. ; PERSON, Veronika ; LORENZEN-SCHMIDT, Ilka ; BANG, Marie-Louise ; HAYASHI, Takeharu ; SHIGA, Nobuyuki ; YASUKAWA, Hideo ; SCHAPER, Wolfgang ; MCKENNA, William ; YOKOYAMA, Mitsuhiro ; SCHORK, Nicholas J. ; OMENS, Jeffrey H. ; MCCULLOCH, Andrew D. ; KIMURA, Akinori ; GREGORIO, Carol C. ; POLLER, Wolfgang ; SCHAPER, Jutta ; SCHULTHEISS, Heinz P. ; CHIEN, Kenneth R.: The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. In: *Cell* 111 (2002), Dec, Nr. 7, S. 943–55
- [61] KRAJINOVIC, M ; PINAMONTI, B ; SINAGRA, G ; VATTA, M ; SEVERINI, GM ; MILASIN, J ; FALASCHI, A ; CAMERINI, F ; GIACCA, M ; MESTRONI, L: Linkage

- of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. Heart Muscle Disease Study Group. In: *Am J Hum Genet* 57 (1995), Oct, Nr. 4, S. 846–52
- [62] LATHROP, GM ; LALOUEL, JM ; JULIER, C ; OTT, J: Strategies for multilocus linkage analysis in humans. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984), Jun, Nr. 11, S. 3443–6
- [63] LEE, W ; HWANG, TH ; KIMURA, A ; PARK, SW ; SATOH, M ; NISHI, H ; HARADA, H ; TOYAMA, J ; PARK, JE: Different expressivity of a ventricular essential myosin light chain gene Ala57Gly mutation in familial hypertrophic cardiomyopathy. In: *Am Heart J* 141 (2001), Feb, Nr. 2, S. 184–9
- [64] LI, D ; TAPSCOTT, T ; GONZALEZ, O ; BURCH, PE ; QUIÑONES, MA ; ZOGHBI, WA ; HILL, R ; BACHINSKI, LL ; MANN, DL ; ROBERTS, R: Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. In: *Circulation* 100 (1999), Aug, Nr. 5, S. 461–4
- [65] LI, Yu ; MUI, Suet ; BROWN, Jerry H. ; STRAND, James ; RESHETNIKOVA, Ludmilla ; TOBACMAN, Larry S. ; COHEN, Carolyn: The crystal structure of the C-terminal fragment of striated-muscle alpha-tropomyosin reveals a key troponin T recognition site. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), May, Nr. 11, 7378–83. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1021799999>. – DOI 10.1073/pnas.1021799999
- [66] LILJE, Christian ; RÁZEK, Vit ; JOYCE, James J. ; RAU, Thomas ; FINCKH, Barbara F. ; WEISS, Florian ; HABERMANN, Christian R. ; RICE, Janet C. ; WEIL, Jochen: Complications of non-compaction of the left ventricular myocardium in a paediatric population: a prospective study. In: *Eur Heart J* 27 (2006), Aug, Nr. 15, 1855–60. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehl112>. – DOI 10.1093/eurheartj/ehl112
- [67] LYONS, I ; PARSONS, LM ; HARTLEY, L ; LI, R ; ANDREWS, JE ; ROBB, L ; HARVEY, RP: Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. In: *Genes Dev* 9 (1995), Jul, Nr. 13, S. 1654–66
- [68] MARON, Barry J. ; TOWBIN, Jeffrey A. ; THIENE, Gaetano ; ANTZELEVITCH, Charles ; CORRADO, Domenico ; ARNETT, Donna ; MOSS, Arthur J. ; SEIDMAN, Christine E. ; YOUNG, James B. ; ASSOCIATION, American H. ; CLINICAL CARDIOLOGY, Heart F. o. ; COMMITTEE, Transplantation ; CARE, Quality of ; RESEARCH, Outcomes ; GENOMICS, Functional ; GROUPS, Translational

- Biology Interdisciplinary W. ; EPIDEMIOLOGY, Council on ; PREVENTION: Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. In: *Circulation* 113 (2006), Apr, Nr. 14, S. 1807–16
- [69] MESSINA, DN ; SPEER, MC ; PERICAK-VANCE, MA ; McNALLY, EM: Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. In: *Am J Hum Genet* 61 (1997), Oct, Nr. 4, S. 909–17
- [70] MOGENSEN, J ; KLAUSEN, IC ; PEDERSEN, AK ; EGEHLAD, H ; BROSS, P ; KRUSE, TA ; GREGERSEN, N ; HANSEN, PS ; BAANDRUP, U ; BORGLUM, AD: Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. In: *J Clin Invest* 103 (1999), May, Nr. 10, S. R39–43
- [71] MOGENSEN, Jens ; KUBO, Toru ; DUQUE, Mauricio ; URIBE, William ; SHAW, Anthony ; MURPHY, Ross ; GIMENO, Juan R. ; ELLIOTT, Perry ; MCKENNA, William J.: Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. In: *J Clin Invest* 111 (2003), Jan, Nr. 2, S. 209–16
- [72] MOGENSEN, Jens ; MURPHY, Ross T. ; SHAW, Tony ; BAHL, Ajay ; REDWOOD, Charles ; WATKINS, Hugh ; BURKE, Margaret ; ELLIOTT, Perry M. ; MCKENNA, William J.: Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. In: *J Am Coll Cardiol* 44 (2004), Nov, Nr. 10, 2033–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2004.08.027>. – DOI 10.1016/j.jacc.2004.08.027
- [73] MONSERRAT, Lorenzo ; HERMIDA-PRIETO, Manuel ; FERNANDEZ, Xusto ; RODRÍGUEZ, Isabel ; DUMONT, Carlos ; CAZÓN, Laura ; CUESTA, Margarita G. ; GONZALEZ-JUANATEY, Carlos ; PETEIRO, Jesús ; ALVAREZ, Nemesio ; PENAS-LADO, Manuel ; CASTRO-BEIRAS, Alfonso: Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. In: *Eur Heart J* 28(16) (2007), 1953–1961. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehm239>. – DOI 10.1093/eurheartj/ehm239
- [74] MOOLMAN, JC ; CORFIELD, VA ; POSEN, B ; NGUMBELA, K ; SEIDMAN, C ; BRINK, PA ; WATKINS, H: Sudden death due to troponin T mutations. In: *J Am Coll Cardiol* 29 (1997), Mar, Nr. 3, S. 549–55

- [75] MOOLMAN-SMOOK, Johanna C. ; MAYOSI, Bongani M. ; BRINK, Paul A. ; CORFIELD, Valerie A.: Molecular genetics of cardiomyopathy: changing times, shifting paradigms. In: *Cardiovasc J S Afr* 14 (2003), Nr. 3, S. 145–55
- [76] MURPHY, Ross T. ; THAMAN, Rajesh ; BLANES, Juan G. ; WARD, Deirdre ; SEVDALIS, Elias ; PAPRA, Efi ; KIOTSEKOLGLOU, Anatoli ; TOME, Maria T. ; PELLERIN, Denis ; MCKENNA, William J. ; ELLIOTT, Perry M.: Natural history and familial characteristics of isolated left ventricular non-compaction. In: *Eur Heart J* 26 (2005), Jan, Nr. 2, 187-92. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehi025>. – DOI 10.1093/eurheartj/ehi025
- [77] NEUHAUS, H ; ROSEN, V ; THIES, RS: Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. In: *Mech Dev* 80 (1999), Feb, Nr. 2, S. 181–4
- [78] NIIMURA, Hideshi ; PATTON, Kristen K. ; MCKENNA, William J. ; SOULTS, Johann ; MARON, Barry J. ; SEIDMAN, JG ; SEIDMAN, Christine E.: Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. In: *Circulation* 105 (2002), Jan, Nr. 4, S. 446–51
- [79] O'CONNELL, JR ; WEEKS, DE: PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. In: *Am J Hum Genet* 63 (1998), Jul, Nr. 1, S. 259–66
- [80] OECHSLIN, EN ; JOST, CH A. ; ROJAS, JR ; KAUFMANN, PA ; JENNI, R: Long-term follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: a distinct cardiomyopathy with poor prognosis. In: *J Am Coll Cardiol* 36 (2000), Aug, Nr. 2, S. 493–500
- [81] OEFNER, Peter J. ; UNDERHILL, Peter A.: Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). In: *Am J Hum Genet* 57 (Suppl) (1995), S. A266
- [82] OLSON, TM ; DOAN, TP ; KISHIMOTO, NY ; WHITBY, FG ; ACKERMAN, MJ ; FANANAPAZIR, L: Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. In: *J Mol Cell Cardiol* 32 (2000), Sep, Nr. 9, 1687-94. <http://dx.doi.org/10.1006/jmcc.2000.1204>. – DOI 10.1006/jmcc.2000.1204
- [83] OLSON, TM ; KEATING, MT: Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. In: *J Clin Invest* 97 (1996), Jan, Nr. 2, S. 528–32

- [84] OLSON, TM ; KISHIMOTO, NY ; WHITBY, FG ; MICHELS, VV: Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. In: *J Mol Cell Cardiol* 33 (2001), Apr, Nr. 4, 723-32. <http://dx.doi.org/10.1006/jmcc.2000.1339>. – DOI 10.1006/jmcc.2000.1339
- [85] OLSON, TM ; MICHELS, VV ; THIBODEAU, SN ; TAI, YS ; KEATING, MT: Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. In: *Science* 280 (1998), May, Nr. 5364, S. 750–2
- [86] PADGETT, RA ; GRABOWSKI, PJ ; KONARSKA, MM ; SEILER, S ; SHARP, PA: Splicing of messenger RNA precursors. In: *Annu Rev Biochem* 55 (1986), 1119-50. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005351>. – DOI 10.1146/annurev.bi.55.070186.005351
- [87] PALM, T ; GRABOSKI, S ; HITCHCOCK-DEGREGORI, SE ; GREENFIELD, NJ: Disease-causing mutations in cardiac troponin T: identification of a critical tropomyosin-binding region. In: *Biophys J* 81 (2001), Nov, Nr. 5, S. 2827–37
- [88] PASHMFOROUSH, Mohammad ; LU, Jonathan T. ; CHEN, Hanying ; AMAND, Tara S. ; KONDO, Richard ; PRADERVAND, Sylvain ; EVANS, Sylvia M. ; CLARK, Bob ; FERAMISCO, James R. ; GILES, Wayne ; HO, Siew Y. ; BENSON, D W. ; SILBERBACH, Michael ; SHOU, Weinian ; CHIEN, Kenneth R.: Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. In: *Cell* 117 (2004), Apr, Nr. 3, S. 373–86
- [89] PAULHE, Frédérique ; PERRET, Bertrand ; CHAP, Hugues ; IBERG, Niggi ; MORAND, Olivier ; RACAUD-SULTAN, Claire: Phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated upon smooth muscle cell migration and regulated by alpha(v)beta(3) integrin engagement. In: *Biochem Biophys Res Commun* 297 (2002), Sep, Nr. 2, S. 261–6
- [90] PAULI, RM ; SCHEIB-WIXTED, S ; CRIPE, L ; IZUMO, S ; SEKHON, GS: Ventricular noncompaction and distal chromosome 5q deletion. In: *Am J Med Genet* 85 (1999), Aug, Nr. 4, S. 419–23
- [91] PERRY, SV: Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. In: *J Muscle Res Cell Motil* 22 (2001), Nr. 1, S. 5–49
- [92] POETTER, K ; JIANG, H ; HASSANZADEH, S ; MASTER, SR ; CHANG, A ; DALAKAS, MC ; RAYMENT, I ; SELLERS, JR ; FANANAPAZIR, L ; EPSTEIN, ND:

- Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. In: *Nat Genet* 13 (1996), May, Nr. 1, 63-9. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0596-63>. – DOI 10.1038/ng0596-63
- [93] PRABHAKAR, Rethinasamy ; PETRASHEVSKAYA, Natalia ; SCHWARTZ, Arnold ; ARONOW, Bruce ; BOIVIN, Greg P. ; MOKKENTIN, Jeffery D. ; WIECZOREK, David F.: A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by a alpha-tropomyosin mutation. In: *Mol Cell Biochem* 251 (2003), Sep, Nr. 1-2, S. 33-42
- [94] RAPEZZI, Claudio ; LEONE, Ornella ; FERLITO, Marinella ; BIAGINI, Elena ; COCCOLO, Fabio ; ARPESELLA, Giorgio: Isolated ventricular non-compaction with restrictive cardiomyopathy. In: *Eur Heart J* 27 (2006), Aug, Nr. 16, 1927. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehi765>. – DOI 10.1093/eurheartj/ehi765
- [95] RAYMENT, I ; RYPNIEWSKI, WR ; SCHMIDT-BÄSE, K ; SMITH, R ; TOMCHICK, DR ; BENNING, MM ; WINKELMANN, DA ; WESENBERG, G ; HOLDEN, HM: Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. In: *Science* 261 (1993), Jul, Nr. 5117, S. 50-8
- [96] RICHARD, Pascale ; CHARRON, Philippe ; CARRIER, Lucie ; LEDEUIL, Céline ; CHEAV, Theary ; PICHEREAU, Claire ; BENAICHE, Abdelaziz ; ISNARD, Richard ; DUBOURG, Olivier ; BURBAN, Marc ; GUEFFET, Jean-Pierre ; MILLAIRE, Alain ; DESNOS, Michel ; SCHWARTZ, Ketty ; HAINQUE, Bernard ; KOMAJDA, Michel ; PROJECT, EUROGENE Heart F.: Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. In: *Circulation* 107 (2003), May, Nr. 17, S. 2227-32
- [97] RICHARDSON, P ; MCKENNA, W ; BRISTOW, M ; MAISCH, B ; MAUTNER, B ; O'CONNELL, J ; OLSEN, E ; THIENE, G ; GOODWIN, J ; GYARFAS, I ; MARTIN, I ; NORDET, P: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. In: *Circulation* 93 (1996), Mar, Nr. 5, S. 841-2
- [98] RITTER, M ; OECHSLIN, E ; SÜTSCH, G ; ATTENHOFER, C ; SCHNEIDER, J ; JENNI, R: Isolated noncompaction of the myocardium in adults. In: *Mayo Clin Proc* 72 (1997), Jan, Nr. 1, S. 26-31

- [99] ROBINSON, Paul ; GRIFFITHS, Peter J. ; WATKINS, Hugh ; REDWOOD, Charles S.: Dilated and Hypertrophic Cardiomyopathy Mutations in Troponin and alpha-Tropomyosin Have Opposing Effects on the Calcium Affinity of Cardiac Thin Filaments. In: *Circ Res* 101 (2007), 1266-1273. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.156380>. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.107.156380
- [100] SAMBROCK (Hrsg.): *Molecular Cloning/ A Laboratory Manual*. 1989
- [101] SANGER, F ; NICKLEN, S ; COULSON, A R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977), Dec, S. 5463–5467
- [102] SASSE-KLAASSEN, Sabine ; GERULL, Brenda ; OECHSLIN, Erwin ; JENNI, Rolf ; THIERFELDER, Ludwig: Isolated noncompaction of the left ventricular myocardium in the adult is an autosomal dominant disorder in the majority of patients. In: *Am J Med Genet A* 119 (2003), Jun, Nr. 2, 162-7. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20075>. – DOI 10.1002/ajmg.a.20075
- [103] SASSE-KLAASSEN, Sabine ; PROBST, Susanne ; GERULL, Brenda ; OECHSLIN, Erwin ; NÜRNBERG, Peter ; HEUSER, Arnd ; JENNI, Rolf ; HENNIES, Hans C. ; THIERFELDER, Ludwig: Novel gene locus for autosomal dominant left ventricular noncompaction maps to chromosome 11p15. In: *Circulation* 109 (2004), Jun, Nr. 22, 2720-3. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000131865.21260.56>. – DOI 10.1161/01.CIR.0000131865.21260.56
- [104] SATOH, M ; TAKAHASHI, M ; SAKAMOTO, T ; HIROE, M ; MARUMO, F ; KIMURA, A: Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. In: *Biochem Biophys Res Commun* 262 (1999), Aug, Nr. 2, 411-7. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1999.1221>. – DOI 10.1006/bbrc.1999.1221
- [105] SCHMITT, Tami J. ; ROBINSON, Missi L. ; DOYLE, Jed: Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System / Transgenomic®. 2000 (112). – Application Note
- [106] SCHÖNBERGER, Jost ; WANG, Libin ; SHIN, Jordan T. ; KIM, Sang D. ; DEPREUX, Frederic F S. ; ZHU, Hao ; ZON, Leonard ; PIZARD, Anne ; KIM, Jae B. ; MACRAE, Calum A. ; MUNGALL, Andy J. ; SEIDMAN, JG ; SEIDMAN, Christine E.: Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. In: *Nat Genet* 37 (2005), Apr, Nr. 4, 418-22. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1527>. – DOI 10.1038/ng1527

- [107] SEDMERA, D ; PEXIEDER, T ; VUILLEMIN, M ; THOMPSON, RP ; ANDERSON, RH: Developmental patterning of the myocardium. In: *Anat Rec* 258 (2000), Apr, Nr. 4, S. 319–37
- [108] SEIDMAN, JG ; SEIDMAN, C: The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. In: *Cell* 104 (2001), Feb, Nr. 4, S. 557–67
- [109] SHI, Wei ; CHEN, Hui ; SUN, Jianping ; BUCKLEY, Sue ; ZHAO, Jingsong ; ANDERSON, Kathryn D. ; WILLIAMS, Roberta G. ; WARBURTON, David: TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling. In: *Dev Biol* 261 (2003), Sep, Nr. 2, S. 371–80
- [110] SHOU, W ; AGHDASI, B ; ARMSTRONG, DL ; GUO, Q ; BAO, S ; CHARNG, MJ ; MATHEWS, LM ; SCHNEIDER, MD ; HAMILTON, SL ; MATZUK, MM: Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. In: *Nature* 391 (1998), Jan, Nr. 6666, 489–92. <http://dx.doi.org/10.1038/35146>. – DOI 10.1038/35146
- [111] SOBEL, E ; LANGE, K: Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. In: *Am J Hum Genet* 58 (1996), Jun, Nr. 6, S. 1323–37
- [112] SPIRITO, P ; SEIDMAN, CE ; MCKENNA, WJ ; MARON, BJ: The management of hypertrophic cardiomyopathy. In: *N Engl J Med* 336 (1997), Mar, Nr. 11, S. 775–85
- [113] SUMMERTON, J ; WELLER, D: Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. In: *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7 (1997), Jun, Nr. 3, S. 187–95
- [114] TANAKA, M ; CHEN, Z ; BARTUNKOVA, S ; YAMASAKI, N ; IZUMO, S: The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. In: *Development* 126 (1999), Mar, Nr. 6, S. 1269–80
- [115] TAYLOR, Todd D. ; NOGUCHI, Hideki ; TOTOKI, Yasushi ; TOYODA, Atsushi ; KUROKI, Yoko ; DEWAR, Ken ; LLOYD, Christine ; ITOH, Takehiko ; TAKEDA, Tadayuki ; KIM, Dae-Won ; SHE, Xinwei ; BARLOW, Karen F. ; BLOOM, Toby ; BRUFORD, Elspeth ; CHANG, Jean L. ; CUOMO, Christina A. ; EICHLER, Evan ; FITZGERALD, Michael G. ; JAFFE, David B. ; LABUTTI, Kurt ; NICOL, Robert ;

- PARK, Hong-Seog ; SEAMAN, Christopher ; SOUGNEZ, Carrie ; YANG, Xiaoping ; ZIMMER, Andrew R. ; ZODY, Michael C. ; BIRREN, Bruce W. ; NUSBAUM, Chad ; FUJIYAMA, Asao ; HATTORI, Masahira ; ROGERS, Jane ; LANDER, Eric S. ; SAKAKI, Yoshiyuki: Human chromosome 11 DNA sequence and analysis including novel gene identification. In: *Nature* 440 (2006), Mar, Nr. 7083, 497-500. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04632>. – DOI 10.1038/nature04632
- [116] THIERFELDER, L ; WATKINS, H ; MACRAE, C ; LAMAS, R ; MCKENNA, W ; VOSBERG, HP ; SEIDMAN, JG ; SEIDMAN, CE: Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. In: *Cell* 77 (1994), Jun, Nr. 5, S. 701–12
- [117] TORRICELLI, Francesca ; GIROLAMI, Francesca ; OLIVOTTO, Iacopo ; PASSERINI, Ilaria ; FRUSCONI, Sabrina ; VARGIU, Daniela ; RICHARD, Pascale ; CECCHI, Franco: Prevalence and clinical profile of troponin T mutations among patients with hypertrophic cardiomyopathy in tuscany. In: *Am J Cardiol* 92 (2003), Dec, Nr. 11, S. 1358–62
- [118] TSOKA, S ; OUZOUNIS, CA: Prediction of protein interactions: metabolic enzymes are frequently involved in gene fusion. In: *Nat Genet* 26 (2000), Oct, Nr. 2, 141-2. <http://dx.doi.org/10.1038/79847>. – DOI 10.1038/79847
- [119] VALENCIK, Maria L. ; ZHANG, Dongfang ; PUNSKE, Bonnie ; HU, Ping ; McDONALD, John A. ; LITWIN, Sheldon E.: Integrin activation in the heart: a link between electrical and contractile dysfunction? In: *Circ Res* 99 (2006), Dec, Nr. 12, 1403-10. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000252291.88540.ac>. – DOI 10.1161/01.RES.0000252291.88540.ac
- [120] VATTA, Matteo ; MOHAPATRA, Bhagyalaxmi ; JIMENEZ, Shinawe ; SANCHEZ, Ximena ; FAULKNER, Georgine ; PERLES, Zeev ; SINAGRA, Gianfranco ; LIN, Jiuann-Huey ; VU, Thuy M. ; ZHOU, Qiang ; BOWLES, Karla R. ; LENARDA, Andrea D. ; SCHIMMENTI, Lisa ; FOX, Michelle ; CHRISCO, Michelle A. ; MURPHY, Ross T. ; MCKENNA, William ; ELLIOTT, Perry ; BOWLES, Neil E. ; CHEN, Ju ; VALLE, Giorgio ; TOWBIN, Jeffrey A.: Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. In: *J Am Coll Cardiol* 42 (2003), Dec, Nr. 11, S. 2014–27
- [121] WAGNER, T ; STOPPA-LYONNET, D ; FLEISCHMANN, E ; MUHR, D ; PAGÈS, S ; SANDBERG, T ; CAUX, V ; MOESLINGER, R ; LANGBAUER, G ; BORG, A ;

- OEFNER, P: Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. In: *Genomics* 62 (1999), Dec, Nr. 3, 369-76. <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1999.6026>. – DOI 10.1006/geno.1999.6026
- [122] WHITE, SP ; COHEN, C ; PHILLIPS, GN: Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. In: *Nature* 325 (1987), Nr. 6107, 826-8. <http://dx.doi.org/10.1038/325826a0>. – DOI 10.1038/325826a0
- [123] WOOLFE, Adam ; GOODSON, Martin ; GOODE, Debbie K. ; SNELL, Phil ; MCEWEN, Gayle K. ; VAVOURI, Tanya ; SMITH, Sarah F. ; NORTH, Phil ; CALLAWAY, Heather ; KELLY, Krys ; WALTER, Klaudia ; ABNIZOVA, Irina ; GILKS, Walter ; EDWARDS, Yvonne J K. ; COOKE, Julie E. ; ELGAR, Greg: Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. In: *PLoS Biol* 3 (2005), Jan, Nr. 1, e7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0030007>. – DOI 10.1371/journal.pbio.0030007
- [124] XING, Yanlin ; ICHIDA, Fukiko ; MATSUOKA, Taro ; ISOBE, Takeshi ; IKEMOTO, Yumiko ; HIGAKI, Takashi ; TSUJI, Tohru ; HANEDA, Noriyuki ; KUWABARA, Atsushi ; CHEN, Rui ; FUTATANI, Takeshi ; TSUBATA, Shinichi ; WATANABE, Sayaka ; WATANABE, Kazuhiro ; HIRONO, Keiichi ; UESE, Keiichiro ; MIYAWAKI, Toshio ; BOWLES, Karla R. ; BOWLES, Neil E. ; TOWBIN, Jeffrey A.: Genetic analysis in patients with left ventricular noncompaction and evidence for genetic heterogeneity. In: *Mol Genet Metab* 88 (2006), May, Nr. 1, 71-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.11.009>. – DOI 10.1016/j.ymgme.2005.11.009
- [125] YU, B ; SAWYER, NA ; CARAMINS, M ; YUAN, ZG ; SAUNDERSON, RB ; PAMPHLETT, R ; RICHMOND, DR ; JEREMY, RW ; TRENT, RJ: Denaturing high performance liquid chromatography: high throughput mutation screening in familial hypertrophic cardiomyopathy and SNP genotyping in motor neurone disease. In: *J Clin Pathol* 58 (2005), May, Nr. 5, 479-85. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2004.021642>. – DOI 10.1136/jcp.2004.021642
- [126] ZHOU, Q ; RUIZ-LOZANO, P ; MARTONE, ME ; CHEN, J: Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Jul, Nr. 28, S. 19807-13

Abbildungsverzeichnis

1.1	Vergleichende Darstellung des Myokards.	2
1.2	Zelluläre Lokalisation und Interaktion von an HCM, DCM und LVNC beteiligten Proteinen.	5
1.3	Beispiel für die Unterscheidung von homomeren und heteromeren DNA-Fragmenten.	8
4.1	Stammbaum der Familie LVNC-105.	36
4.2	Ergebnis der Array-CGH des Patienten III/11.	37
4.3	Grafik der genomweiten Zwei-Punkt-LOD-Wert-Analyse mit Feinkartierungs-STR-Markern der Familie LVNC-105.	40
4.4	Stammbaum der Familie LVNC-105 mit Haplotypen.	41
4.5	Ergebnis der Mehrpunkt-Analyse auf Chromosom 11p15 mit einer Penetranz von 90 %.	43
4.6	Expressionsvergleich in den Lymphozyten von gesunden und erkrankten Mitgliedern der Familie LVNC-105.	47
4.7	Expression im Rattenherzen.	47
4.8	Ergebnisse der Genpriorisierung mit 'Endeavour'.	49
4.9	Stammbaum der Familie LVNC-104.	50
4.10	Alignment von Nkx2.5-Proteinen im Bereich der mutierten Aminosäure.	51
4.11	Alignment von LIM-Domänen-Bindungsproteinen (LDB) im Bereich der mutierten Aminosäure.	52
4.12	Stammbaum der Familie LVNC-119.	52
4.13	Beispiel-Chromatogramme der DHPLC-Analyse von <i>MYH7</i> -Exon9. . .	53
4.14	Alignment von Myosinproteinen im Bereich der mutierten Aminosäuren.	54
4.15	Stammbäume und Sequenzen der Familien mit einer Mutation in <i>MYH7</i>	55
4.16	Häufung der LVNC-Mutation in <i>MYH7</i> bei Exon 8/9.	55
4.17	Verteilung der bekannten Kardiomyopathie-Mutationen im <i>MYH7</i> -Protein.	55

4.18	Positionen der betroffenen Aminosäuren in der ATP-Bindungstasche des MYH7-Proteins.	56
4.19	Transkripte von <i>MYH7</i> (Exon 8 bis 13).	57
4.20	Transkriptsequenzen von <i>MYH7</i>	57
4.21	Alignment von kardialen Troponin T2-Proteinen im Bereich der mutierten Aminosäure.	58
4.22	Stammbaum der Familie LVNC-117 mit Lys248Glu in Exon 8 des <i>TPM1</i> -Gens.	59
4.23	Alignment von Tropomyosinproteinen im Bereich der mutierten Aminosäuren.	59
4.24	Stammbaum der Familie LVNC-102 mit einer Sequenzvariation im <i>MYL2</i> -Gen.	59
5.1	Lokalisation der Proteine im Sarkomer.	67
5.2	LVNC-Mutationen in den regulatorischen Proteinen des dünnen Filaments.	69

Tabellenverzeichnis

3.1	PCR-Bedingungen für die Gene <i>BMP10</i> , <i>Nkx2.5</i> , <i>LDB3</i> und <i>LMNA</i> . .	21
3.2	Verwendete Datenbanken.	32
3.3	Verwendete Software.	32
4.1	Klinische Daten der betroffenen Mitglieder der Familie LVNC-105. . . .	36
4.2	Liste der in der Familie LVNC-105 auf Kopplung untersuchten bereits bekannten LVNC-, DCM- und HCM-Loci.	39
4.3	Zwei-Punkt-LOD-Werte der STR-Marker auf Chromosom 11p15.	42
4.4	Liste der gefundenen Mutationen in Genen sarkomerer Proteine.	53
4.5	Klinische Daten der Erstdiagnose betroffener Familienmitglieder mit Mutationen in sarkomeren Proteinen.	60
A.1	Liste der Gene im LVNC-assoziierten Lokus auf Chromosom 11p15. . .	75

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Susanne Probst

Datum